

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 965 696**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.08.2018 PCT/US2018/048031**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2019 WO19040923**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2018 E 18848036 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2023 EP 3673080**

(54) Título: **Oligómeros antisentido para el tratamiento de afecciones y enfermedades**

(30) Prioridad:

**25.08.2017 US 201762550462 P
23.10.2017 US 201762575901 P
04.05.2018 US 201862667356 P
15.05.2018 US 201862671745 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2024

(73) Titular/es:

**STOKE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
45 Wiggins Avenue
Bedford, MA 01730, US**

(72) Inventor/es:

**AZNAREZ, ISABEL y
HAN, ZHOU**

(74) Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 2 965 696 T3

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

DESCRIPCIÓN

Oligómeros antisentido para el tratamiento de afecciones y enfermedades

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un oligómero antisentido y un portador farmacéuticamente aceptable. Más específicamente, la composición aumenta la expresión de la proteína Navi. 1 en una célula y se usa como un medicamento.

Antecedentes de la invención

Los trastornos del sistema nervioso frecuentemente se asocian con canalopatía, caracterizada por la función alterada de los canales iónicos que median la excitabilidad neuronal, las interacciones neuronales y las funciones cerebrales en general. Las mutaciones en el gen de SCN1A, que forma parte del conglomerado de genes de SCN1A-SCN2A-SCN3A que codifica las subunidades formadoras de poros alfa del canal de sodio dependiente de voltaje neuronal, están asociadas con el desarrollo de varias enfermedades y afecciones, tal como el síndrome de Dravet (DS) (Miller, y otros, 1993-2015, GeneReviews, Eds. Pagon RA, y otros Seattle (WA): University of Washington, Seattle, Bookshelf ID: NBK1318, y Mulley, y otros, 2005, Hum. Mutat. 25: 535-542). Los documentos WO 2017/106377, WO 2015/035091 y Nomakuchi y otros, Nature Biotechnology 34, 164-166 (2016) se relacionan con el uso de oligonucleótidos antisentido en composiciones farmacéuticas.

Resumen

La invención descrita en la presente descripción se expone en las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto, se proporciona una composición farmacéutica para su uso como un medicamento que comprende: un oligómero antisentido y un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde el oligómero antisentido se une a una porción diana de un preARNm que contiene un exón inductor de la descomposición de ARN mediada por mutaciones sin sentido (exón NMD) y que codifica la proteína Nav1.1, de manera que el oligómero antisentido promueve la exclusión del exón NMD del preARNm que contiene el exón NMD y codifica Nav1.1, lo que aumenta de esta manera el nivel de ARNm procesado que codifica la proteína Nav1.1, y aumenta la expresión de la proteína Nav1.1 en una célula que tiene el preARNm, cuando la célula se trata con el oligómero antisentido, en comparación con una célula control correspondiente no tratada con el oligómero antisentido, en donde el exón NMD se localiza en una región de GRCh37/hg19: chr2:166,863,740 a GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En otro aspecto, se proporciona un oligómero antisentido como se establece en las reivindicaciones. Otras descripciones en la presente descripción que no caen dentro de las reivindicaciones son para ayudar al experto en la comprensión y práctica de la invención descrita. Para evitar dudas, se observa que la presente invención no se extiende a métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal. También se describe en la presente descripción, en ciertos casos, un método para modular la expresión de la proteína SCN1A en una célula que tiene un ARNm que contiene un exón inductor de la descomposición de ARN mediada por mutaciones sin sentido (ARNm del exón NMD) y codifica la proteína SCN1A, el método comprende poner en contacto un agente terapéutico a la célula, de manera que el agente terapéutico modula el corte y empalme del exón NMD del ARNm del exón NMD que codifica la proteína SCN1A, lo que modula de esta manera el nivel de ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A y modula la expresión de la proteína SCN1A en la célula. En algunos casos, el agente terapéutico (a) se une a una porción diana del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A; (b) modula la unión de un factor implicado en el corte y empalme del ARNm del exón NMD; o (c) una combinación de (a) y (b). En algunos casos, el agente terapéutico interfiere con la unión del factor implicado en el corte y empalme del exón NMD de una región de la porción diana. En algunos casos, la porción diana está próxima al exón NMD. En algunos casos, la porción diana tiene a lo máximo aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas arriba del extremo 5' del exón NMD. En algunos casos, la porción diana tiene al menos aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas arriba del extremo 5' del exón NMD. En algunos casos, la porción diana tiene al menos aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas abajo del extremo 3' del exón NMD. En algunos casos, la porción diana tiene al menos aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas abajo del extremo 3' del exón NMD.

nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos, aproximadamente 4 nucleótidos, aproximadamente 2 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido aguas abajo del extremo 3' del exón NMD. En algunos casos, la porción diana se localiza en una región intrónica entre dos regiones exónicas canónicas del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A, y en donde la región intrónica contiene el exón NMD. En algunos casos, la porción diana se solapa al menos parcialmente con el exón NMD. En algunos casos, la porción diana comprende la unión exón NMD-intrón 5' o la unión exón NMD-intrón 3'. En algunos casos, la porción diana se encuentra dentro del exón NMD. En algunos casos, la porción diana comprende aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos consecutivos del exón NMD. En algunos casos, el ARNm del exón NMD que codifica SCN1A comprende una secuencia con al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o 7-10. En algunos casos, el ARNm del exón NMD que codifica SCN1A está codificado por una secuencia genética con al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 1 o 3-6. En algunos casos, la porción diana tiene a lo máximo aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos, aproximadamente 4 nucleótidos, aproximadamente 2 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido aguas arriba del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, la porción diana tiene aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos, aproximadamente 4 nucleótidos, aproximadamente 2 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido aguas arriba del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, la porción diana tiene a lo máximo aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos, aproximadamente 4 nucleótidos, aproximadamente 2 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido aguas arriba del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,740. En algunos casos, la porción diana tiene aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos, aproximadamente 4 nucleótidos, aproximadamente 2 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido aguas abajo del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,740. En algunos casos, la porción diana del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A comprende una secuencia con al menos 8 ácidos nucleicos contiguos de la SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2 o 7-10. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 21-67, 210-256 o 304-379. En algunos casos, la porción diana del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A se encuentra dentro del exón 20x inductor de la descomposición de ARN mediada por mutaciones sin sentido de SCN1A. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 42-50 o 231-239. En algunos casos, la porción diana del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A se encuentra aguas arriba o aguas abajo del exón 20x inductor de la descomposición de ARN mediada por mutaciones sin sentido de SCN1A. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 21-38, 53-67, 210-227 o 242-256. En algunos casos, la porción diana del ARNm del exón NMD comprende una unión exón-intrón del exón 20x de SCN1A. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 39-41, 51, 52, 228-230, 240 o 241. En algunos casos, el agente terapéutico promueve la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A. En algunos casos, la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en la célula en contacto con el agente terapéutico aumenta aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces,

célula en contacto con el agente terapéutico disminuye aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces, 5 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, 10 aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 1,1 veces, al menos 15 aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos 20 aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos 25 aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en comparación con una cantidad total del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en una célula de control. En algunos casos, el agente terapéutico disminuye la expresión de la proteína SCN1A en la célula. En algunos casos, una cantidad de SCN1A producida en la célula en contacto con el agente terapéutico disminuye aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, 30 aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, 35 aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, 40 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces, 45 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, 50 aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces, 55 aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, 60 aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces, 65 aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces, 70 aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, 75 aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, 80 aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, 85 aproximadamente 5 a aproximadamente 10 veces, 90 aproximadamente 5 a aproximadamente 10 veces, 95 aproximadamente 6 a aproximadamente 10 veces, 100 aproximadamente 6 a aproximadamente 10 veces, complementario a la porción diana del ARNm del exón NMD que codifica la proteína. En algunos casos, el método comprende además evaluar el ARNm de o la expresión de proteína SCN1A. En algunos casos, las células se encuentran *ex vivo*.

En la presente descripción, en ciertos casos, se describe un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita mediante la modulación de la expresión de la proteína SCN1A en una célula del sujeto, que comprende: poner en contacto la célula del sujeto con un agente terapéutico que modula el corte y empalme de un exón inductor de la descomposición de ARNm mediada por mutaciones sin sentido (exón NMD) a partir de un ARNm en la célula que contiene el exón NMD y codifica SCN1A, lo que modula de esta manera el nivel de ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A y modula la expresión de la proteína SCN1A en la célula del sujeto. En algunos casos, el agente terapéutico (a) se une a una porción diana del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A; (b) modula la unión de un factor implicado en el corte y empalme del ARNm del exón NMD; o (c) una combinación de (a) y (b). En algunos casos, el agente terapéutico interfiere con la unión del factor implicado en el corte y empalme del exón NMD de una región de la porción diana. En algunos casos, la porción diana está próxima al exón NMD. En algunos casos, la porción diana tiene a lo máximo aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80

nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas arriba del extremo 5' del exón NMD. En algunos casos, la porción diana tiene al menos aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos, aproximadamente 4 nucleótidos, aproximadamente 2 nucleótidos, aguas arriba del extremo 5' del exón NMD. En algunos casos, la porción diana tiene a lo máximo aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas abajo del extremo 3' del exón NMD. En algunos casos, la porción diana tiene al menos aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 5 nucleótidos, aproximadamente 4 nucleótidos, aproximadamente 2 nucleótidos, aproximadamente 1 nucleótido aguas abajo del extremo 3' del exón NMD. En algunos casos, la porción diana se localiza en una región intrónica entre dos regiones exónicas canónicas del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A, y en donde la región intrónica contiene el exón NMD. En algunos casos, la porción diana se solapa al menos parcialmente con el exón NMD. En algunos casos, la porción diana se solapa al menos parcialmente con un intrón aguas arriba del exón NMD. En algunos casos, la porción diana comprende la unión exón NMD-intrón 5' o la unión exón NMD-intrón 3'. En algunos casos, la porción diana se encuentra dentro del exón NMD. En algunos casos, la porción diana comprende aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos consecutivos del exón NMD. En algunos casos, el ARNm del exón NMD que codifica SCN1A comprende una secuencia con al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o 7-10. En algunos casos, el ARNm del exón NMD que codifica SCN1A está codificado por una secuencia genética con al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 1 o 3-6. En algunos casos, la porción diana tiene a lo máximo aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas arriba del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, la porción diana tiene aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas arriba del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, la porción diana tiene a lo máximo aproximadamente 1500 nucleótidos, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas abajo del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,740. En algunos casos, la porción diana tiene aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 80 nucleótidos, aproximadamente 70 nucleótidos, aproximadamente 60 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos aguas abajo del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,740. En algunos casos, la porción diana del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A comprende una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con una región que comprende al menos 8 ácidos nucleicos contiguos de la SEQ ID NO: SEQ ID NO: 2 o 7-10. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 21-67, 210-256 o 304-379. En algunos casos, la porción diana del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A se

encuentra dentro del exón 20x inductor de la descomposición de ARN mediada por mutaciones sin sentido de SCN1A. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 42-50 o 231-239. En algunos casos, la porción diana del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A se encuentra aguas arriba o aguas abajo del exón 20x inductor de la descomposición de ARN mediada por mutaciones sin sentido de SCN1A. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 21-38, 53-67, 210-227 o 242-256. En algunos casos, la porción diana del ARNm del exón NMD comprende una unión exón-intrón del exón 20x de SCN1A. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: 39-41, 51, 52, 228-230, 240 o 241. En algunos casos, el agente terapéutico promueve la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A. En algunos casos, la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en la célula en contacto con el agente terapéutico aumenta aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 4 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 1,1 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en comparación con la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en una célula de control. En algunos casos, el agente terapéutico aumenta el nivel del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en la célula. En algunos casos, una cantidad del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en la célula en contacto con el agente terapéutico aumenta aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 1,1 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en comparación con una cantidad total del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en una célula de control. En algunos casos, el agente terapéutico aumenta la expresión de la proteína SCN1A en la célula. En algunos casos, una cantidad de SCN1A producida en la célula en contacto con el agente terapéutico aumenta aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 1,1 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en comparación con una cantidad total de SCN1A producida en una célula de control. En algunos casos, el agente terapéutico inhibe la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A. En algunos casos, la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en la célula en contacto con el agente terapéutico disminuye

aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces,
 aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces,
 aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces,
 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces,
 5 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 9 veces,
 aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces,
 aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces,
 aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 6 veces,
 10 aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 8 veces,
 aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 7 veces,
 aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, al menos
 aproximadamente 1,1 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos
 15 aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos
 aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en
 comparación con la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en una célula de
 control. En algunos casos, el agente terapéutico disminuye el nivel del ARNm procesado que codifica la proteína
 SCN1A en la célula. En algunos casos, una cantidad del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en la
 célula en contacto con el agente terapéutico disminuye aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces,
 20 aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces,
 aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces,
 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces,
 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces,
 25 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces,
 aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces,
 aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces,
 aproximadamente 3 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces,
 30 aproximadamente 3 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces,
 aproximadamente 4 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces,
 aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 1,1 veces, al menos
 35 aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos
 aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos
 aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en comparación con una cantidad total del
 ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A en una célula de control. En algunos casos, el agente terapéutico
 40 disminuye la expresión de la proteína SCN1A en la célula. En algunos casos, una cantidad de SCN1A producida en
 la célula en contacto con el agente terapéutico disminuye aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces,
 aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces,
 45 aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces,
 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces,
 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces,
 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces,
 50 aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces,
 aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces,
 aproximadamente 3 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces,
 55 aproximadamente 3 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces,
 aproximadamente 4 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces,
 aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 1,1 veces, al menos
 60 aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos
 aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos
 65 aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en comparación con una cantidad total de
 SCN1A producida en una célula de control. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido
 (ASO) y en donde el oligómero antisentido comprende una modificación de la cadena principal que comprende un
 enlace fosforotioato o un enlace fosforodiamidato. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero
 antisentido (ASO) y en donde el oligómero antisentido comprende un fosforodiamidato morfolino, un ácido nucleico
 bloqueado, un ácido nucleico peptídico, un resto 2'-O-metilo, 2'-fluoro o 2'-O-metoxietilo. En algunos casos, el agente
 terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el oligómero antisentido comprende al menos un resto de
 azúcar modificado. En algunos casos, cada resto de azúcar es un resto de azúcar modificado. En algunos casos, el
 agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el oligómero antisentido consiste en de 8 a 50
 nucleobases, 8 a 40 nucleobases, 8 a 35 nucleobases, 8 a 30 nucleobases, 8 a 25 nucleobases, 8 a 20
 nucleobases, 8 a 15 nucleobases, 9 a 50 nucleobases, 9 a 40 nucleobases, 9 a 35 nucleobases, 9 a 30
 nucleobases, 9 a 25 nucleobases, 9 a 20 nucleobases, 9 a 15 nucleobases, 10 a 50 nucleobases, 10 a 40
 nucleobases, 10 a 35 nucleobases, 10 a 30 nucleobases, 10 a 25 nucleobases, 10 a 20 nucleobases, 10 a 15
 nucleobases, 11 a 50 nucleobases, 11 a 40 nucleobases, 11 a 35 nucleobases, 11 a 30 nucleobases, 11 a 25
 nucleobases, 11 a 20 nucleobases, 11 a 15 nucleobases, 12 a 50 nucleobases, 12 a 40 nucleobases, 12 a 35
 nucleobases, 12 a 30 nucleobases, 12 a 25 nucleobases, 12 a 20 nucleobases o 12 a 15 nucleobases. En algunos
 casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el oligómero antisentido es al menos 80
 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 %, complementario a la

porción diana del ARNm del exón NMD que codifica la proteína. En algunos casos, el método comprende además evaluar el ARNm de o la expresión de proteína SCN1A. En algunos casos, la enfermedad o afección es inducida por una mutación de pérdida de función en Na_v1.1. En algunos casos, la enfermedad o afección se asocia con haploinsuficiencia del gen SCN1A, y en donde el sujeto tiene un primer alelo que codifica una SCN1A funcional, y un segundo alelo a partir del cual SCN1A no se produce o se produce a un nivel reducido, o un segundo alelo que codifica una SCN1A no funcional o una SCN1A parcialmente funcional. En algunos casos, la enfermedad o afección es encefalopatía. En algunos casos, la encefalopatía es encefalopatía epiléptica. En algunos casos, la enfermedad o afección es el Síndrome de Dravet (DS); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI)-zona límite (SMEB); convulsión febril (FS); epilepsia generalizada con convulsiones febres plus (GEFS+); encefalopatía epiléptica infantil temprana, 13; epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclónica-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; encefalopatía mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epiléptica no clasificada; muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); síndrome del seno enfermo 1; autismo; o convulsiones parciales migratorias malignas de la infancia. En algunos casos, GEFS+ es epilepsia, generalizada, con convulsiones febres plus, tipo 2. En algunos casos, la convulsión febril es convulsiones febres familiares, 3A. En algunos casos, SMEB es SMEB sin punta-onda generalizada (SMEB-SW), SMEB sin convulsiones mioclónicas (SMEB-M), SMEB que carece de más de una característica de SMEI (SMEB-O), o epilepsia infantil intratable con convulsiones tónicas-clónicas generalizada (ICEGTC). En algunos casos, el agente terapéutico promueve la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A y aumenta la expresión de SCN1A en la célula. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % complementaria de cualquiera de las SEQ ID NO: 22-24, 26, 27, 29-35, 37-62, 64-67 o 304-379. En algunos casos, la enfermedad o afección es inducida por una mutación de ganancia de función en Na_v1.1. En algunos casos, el sujeto tiene un alelo a partir del cual se produce SCN1A en un nivel aumentado, o un alelo que codifica una SCN1A mutante que induce una mayor actividad de Na_v1.1 en la célula. En algunos casos, la enfermedad o afección es migraña. En algunos casos, la migraña es migraña, hemipléjica familiar, 3. En algunos casos, la enfermedad o afección es epilepsia genética por Na_v1.1. En algunos casos, el agente terapéutico inhibe la exclusión del exón NMD del ARNm procesado que codifica la proteína SCN1A y disminuye la expresión de SCN1A en la célula. En algunos casos, el agente terapéutico es un oligómero antisentido (ASO) y en donde el ASO comprende una secuencia que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % complementaria de cualquiera de las SEQ ID NO: 21, 25, 28, 36 o 63. En algunos casos, el sujeto es un ser humano. En algunos casos, el sujeto es un animal no humano. En algunos casos, el sujeto es un feto, un embrión o un niño. En algunos casos, el agente terapéutico se administra mediante inyección intratecal, inyección intracerebroventricular, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravítreo o intravenosa del sujeto. En algunos casos, el método comprende además administrar un segundo agente terapéutico al sujeto. En algunos casos, el segundo agente terapéutico es una molécula pequeña. En algunos casos, el segundo agente terapéutico es un ASO. En algunos casos, el ASO comprende una secuencia que es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % complementaria con cualquiera de las SEQ ID NO: 115-161. En algunos casos, el segundo agente terapéutico corrige la retención de intrones. En algunos casos, la enfermedad o afección es la enfermedad de Alzheimer, la encefalopatía por SCN2A, la encefalopatía por SCN8A o la arritmia por SCN5A. En algunos casos, la enfermedad o afección es la enfermedad de Alzheimer, la encefalopatía por SCN2A, la encefalopatía por SCN8A o la arritmia por SCN5A. En algunos casos, las células se encuentran ex vivo.

Se hace referencia en la presente descripción a todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta descripción para ayuda del experto.

Breve descripción de las figuras

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que expone los ejemplos ilustrativos, en las que se utilizan los principios de la invención, y las figuras adjuntas en las que:

La Figura 1 representa una representación esquemática de un ARNm diana que contiene un exón inductor de la descomposición de ARN mediada por mutaciones sin sentido (ARNm del exón NMD) y una exclusión mediada por un agente terapéutico del exón inductor de la descomposición de ARNm mediada por mutaciones sin sentido para aumentar la expresión de la proteína diana de longitud completa o ARN funcional. La Figura 1A muestra una célula dividida en compartimentos nucleares y citoplasmáticos. En el núcleo, un transcripto de preARNm de un gen diana se somete a corte y empalme para generar ARNm, y este ARNm se exporta al citoplasma y se traduce en proteína diana. Para este gen diana, una fracción del ARNm contiene un exón inductor de la descomposición de ARNm mediada por mutaciones sin sentido (ARNm del exón NMD) que se degrada en el citoplasma, lo que no conduce a la producción de proteínas diana. La Figura 1B muestra un ejemplo de la misma célula dividida en compartimentos nucleares y citoplasmáticos. El tratamiento con un agente terapéutico, tal como un oligómero antisentido (ASO), promueve la exclusión del exón inductor de la descomposición de ARNm mediada por mutaciones sin sentido y da como resultado un aumento del ARNm, que a su vez se traduce en niveles más altos de proteína diana. La Figura 1C es una representación esquemática de la exclusión terapéutica mediada por ASO de un exón inductor de la descomposición de ARNm mediada por mutaciones sin sentido, que

5 convierte un ARNm no productivo en un ARNm productivo y aumenta la expresión de la proteína diana de longitud completa a partir del ARNm productivo.

10 La Figura 2 representa la identificación de un exón ilustrativo inductor de la descomposición de ARNm mediada por mutaciones sin sentido (NMD) en el gen *SCN1A*. Se muestra la identificación del exón inductor de NMD en el gen *SCN1A* mediante el uso de genómica comparativa, visualizada en el navegador del genoma de la UCSC. El panel superior muestra una representación gráfica del gen *SCN1A* a escala. El nivel de conservación entre 100 especies de vertebrados se muestra como picos. Los picos más altos corresponden a los exones (cuadros negros), mientras que no se observan picos para la mayoría de los intrones (líneas con puntas de flecha). Se identificaron picos de conservación en el intrón 20 (NM_006920), mostrados en el panel central. La inspección de las secuencias conservadas identificó una secuencia similar a exón de 64 pb (panel inferior, secuencia resaltada en gris) flanqueada por sitios de corte y empalme 3' y 5' (secuencia subrayada). La inclusión de este exón conduce a un desplazamiento de marco y a la introducción de un codón de terminación prematuro en el exón 21, lo que hace al transcripto una diana de NMD.

15 La Figura 3A representa la confirmación del exón inductor de NMD mediante tratamiento con cicloheximida. El análisis de RT-PCR mediante el uso de ARN citoplasmático de Neuro 2A (células progenitoras neurales de ratón) tratadas con DMSO (CHX-) o cicloheximida (CHX+) y cebadores en el exón 21 y un exón aguas abajo confirmó la presencia de una banda correspondiente al exón inductor de NMD (21x). La identidad del producto se confirmó mediante secuenciación. Se realizó un análisis de densitometría de las bandas para calcular el por ciento de inclusión del exón 21x del transcripto de *SCN1A* total. El tratamiento de Neuro 2A con cicloheximida (CHX+) para inhibir NMD condujo a un aumento de 2 veces del producto correspondiente al exón 21x inductor de NMD en la fracción citoplasmática (cf. barra gris claro, CHX-, a barra gris oscuro, CHX+).

20 La Figura 3B representa la confirmación del exón inductor de NMD mediante tratamiento con cicloheximida. El análisis de RT-PCR mediante el uso de ARN citoplasmático de RenCell VM (células progenitoras neurales humanas) tratadas con DMSO (CHX-) o cicloheximida (CHX+) y cebadores en el exón 20 y el exón 23 confirmó la presencia de una banda correspondiente al exón inductor de NMD (20x). La identidad del producto se confirmó mediante secuenciación. Se realizó un análisis de densitometría de las bandas para calcular el por ciento de inclusión del exón 20x del transcripto de *SCN1A* total. El tratamiento de RenCell VM con cicloheximida (CHX+) para inhibir NMD condujo a un aumento de 2 veces del producto correspondiente al exón 20x inductor de NMD en la fracción citoplasmática (cf. barra gris claro, CHX-, a barra gris oscuro, CHX+).

25 La Figura 4 representa un recorrido con ASO de la región del exón 20 de *SCN1A* ilustrativo. Se muestra una representación gráfica de un recorrido con ASO realizada para secuencias de direccionamiento a la región del exón 20x de *SCN1A* aguas arriba del sitio de corte y empalme 3', a través del sitio de corte y empalme 3', exón 20x, a través del sitio de corte y empalme 5' y aguas abajo del sitio de corte y empalme 5' mediante el uso de 2'-MOE ASO, cadena principal de PS. Los ASO se diseñaron para cubrir estas regiones desplazando 5 nucleótidos a la vez.

30 La Figura 5A representa un recorrido con ASO de la región del exón 20x de *SCN1A* evaluado mediante RT-PCR. Un PAGE representativo muestra productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de *SCN1A* tratada de forma simulada (Falso), tratada con ASO de control SMN (SMN), o tratada con un 2'-MOE ASO que se dirige a la región del exón 20x como se describe en la presente descripción en los Ejemplos y en la descripción de la Figura 4, a una concentración de 20 μ M en células RenCell VM mediante absorción gímnotica. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 20x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 20x, banda inferior).

35 La Figura 5B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 20x a partir de los datos en la Figura 5A. La línea negra indica que no hay cambios con respecto a Falso.

40 La Figura 5C representa un gráfico de los productos de longitud completa normalizados con respecto al control interno *RPL32* y el cambio en veces con relación a Falso. La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a Falso.

45 La Figura 6 representa un recorrido con ASO de la región del exón 20x de *SCN1A* evaluado mediante RT-qPCR. Los resultados de la amplificación de *SCN1A* por RT-qPCR con SYBR-verde normalizado con respecto a *RPL32*, obtenidos mediante el uso del mismo experimento de absorción de ASO que se evaluaron mediante RT-PCR con SYBR-safe como se muestra en la Figura 5, se grafican como cambio en veces con relación a Falso, lo que confirma los resultados de la RT-PCR con SYBR-safe. La línea negra indica una relación de 1 (sin cambios con respecto a Falso).

50 La Figura 7A representa una tabla con miembros de la subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje. Las flechas corresponden a los colores de las barras en la Figura 7B. X indica que no se detectó expresión.

55 La Figura 7B representa ASO seleccionados evaluados por Taqman qPCR de *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN8A* y *SCN9A* para evaluar la selectividad de la diana. Los resultados de amplificación de Taqman-qPCR normalizados con respecto a *RPL32*, obtenidos mediante el uso de los ASO Ex20x+1, IVS20x+18 y IVS20x+33, se grafican como cambio en veces con relación a Falso. La línea negra indica una relación de 1 (sin cambios con respecto a Falso).

60 La Figura 8A representa un efecto dependiente de la dosis ilustrativo de ASO seleccionado en células tratadas con CXH. Se muestra PAGE un representativo que muestra productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de *Scn1a* de ratón tratado de forma simulada (Falso, RNAiMAX solo), o tratado con Ex21x+1 2'-MOE ASO que se dirige al exón 21x (nomenclatura de ratón, corresponde al exón humano 20x), a concentraciones de 30 nM, 80 nM y 200 nM en Neuro 2A (neuroblastoma de ratón) en células mediante transfección RNAiMAX. Ex21x+1 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1 (nomenclatura humana) son idénticos. Se cuantificaron dos productos

- correspondientes a la inclusión del exón 20x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 20x, banda inferior).
- La Figura 8B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 20x a partir de los datos en la Figura 7A. La línea negra indica que no hay cambios con respecto a Falso.
- La Figura 8C representa un gráfico ilustrativo de los productos de longitud completa normalizados con respecto al control interno *Hprt* y se grafica el cambio en veces con relación a Falso. La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a Falso.
- La Figura 9A representa resultados ilustrativos de la inyección intravítreo (IVT) de ASO seleccionados en ratones C57BL6J (machos, 3 meses de edad). Se muestran los geles de PAGE de productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de *Senla* de ratón del ojo izquierdo inyectado con PBS (1 µL) (-) o del ojo derecho inyectado con IVS20x-21, Ex21x+1, IVS21x+18, IVS21x+33 o Cep290 (ASO de control negativo; Gerard y otros, Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015) 2'-MOE ASO (1 µL) (+) a una concentración de 10 mM. Ex21x+1, IVS21x+18 e IVS21x+33 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1, IVS20x+18 e IVS20x+33 (nomenclatura humana) son idénticos. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 21x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 21x, banda inferior).
- La Figura 9B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 21x a partir de los datos en la Figura 9A. Las barras blancas corresponden a ojos inyectados con ASO y las barras grises corresponden a ojos inyectados con PBS, n=5 en cada grupo.
- La Figura 9C representa un gráfico de los productos de longitud completa que se normalizaron con respecto al control interno *Gapdh* y se grafica el cambio en veces del ojo inyectado con ASO con relación al ojo inyectado con PBS. La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a PBS, n=5 en cada grupo.
- La Figura 10A representa resultados ilustrativos de la inyección intracerebroventricular (ICV) de ASO seleccionados en ratones C57BL6J (machos, 3 meses de edad). Se muestran los geles de PAGE de productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de *Scn1a* de ratón de cerebro no inyectado (-, sin control de ASO) o inyectado con 300 µg de Cep290 (ASO de control negativo; Gerard y otros, Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015), Ex21x+1, IVS21x+18, IVS21x+33 2'-MOE ASO. Ex21x+1, IVS21x+18 e IVS21x+33 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1, IVS20x+18 e IVS20x+33 (nomenclatura humana) son idénticos. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 21x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 21x, banda inferior).
- La Figura 10B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 21x a partir de los datos en la Figura 10A, n=6 (cada ASO de direccionamiento), n=5 (Cep290 ASO), n=1 (no inyectado, sin control de ASO).
- La Figura 10C representa un gráfico de los resultados de un ensayo de qPCR Taqman realizado mediante el uso de dos sondas diferentes que abarcan la unión de los exones 21 y 22. Los productos se normalizaron con respecto al control interno de *Gapdh* y se grafica el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los cerebros inyectados con Cep290. La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a Cep290, n=6 (cada ASO de direccionamiento), n=5 (Cep290 ASO), n=1 (no inyectado, sin control de ASO).
- La Figura 11A representa resultados ilustrativos de la inyección intracerebroventricular (ICV) de ASO seleccionados en ratones C57BL6J (machos, 3 meses de edad). Se muestran geles de PAGE de productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de *Scn1a* de ratón de cerebros inyectados con 300 ug de Cep290 (ASO de control negativo; Gerard y otros, Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015), o 33 ug, 100 ug y 300 ug de Ex21x+1 2'-MOE ASO. Ex21x+1 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1 (nomenclatura humana) son idénticos. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 21x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 21x, banda inferior).
- La Figura 11B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 21x a partir de los datos en la Figura 11A, n=5 (cada grupo).
- La Figura 11C representa un gráfico de los resultados de un ensayo de qPCR Taqman realizado mediante el uso de dos sondas diferentes que abarcan la unión de los exones 21 y 22. Los productos se normalizaron con respecto al control interno de *Gapdh* y se grafica el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los cerebros inyectados con Cep290. La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a Cep290, n=5 (cada grupo).
- La Figura 12A representa resultados ilustrativos de la inyección intracerebroventricular (ICV) de un ASO seleccionado en ratones C57BL6J (día después del nacimiento 2). Se muestran los geles de PAGE de productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de *Scn1a* de ratón de cerebros no inyectados (-, sin control de ASO) o inyectados con 20 µg de 2'-MOE ASO para Ex21x+1. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 21x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 21x, banda inferior). Ex21x+1 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1 (nomenclatura humana) son idénticos.
- La Figura 12B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 21x a partir de los datos en la Figura 12A, n=4 (cada grupo).
- La Figura 12C representa un gráfico de los resultados de un ensayo de qPCR Taqman realizado mediante el uso de dos sondas diferentes que abarcan la unión de los exones 21 y 22. Los productos se normalizaron con respecto al control interno de *Gapdh* y se grafica el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los cerebros sin control de ASO. La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto al control sin ASO, n=4 (cada grupo).
- La Figura 13A representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 21x en las muestras de CNS de ratón indicadas.
- La Figura 13B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 20x en las muestras de CNS

- humano indicadas.
- La Figura 14A representa un gráfico que grafica la disminución porcentual en la inclusión del exón 21x en las dosis indicadas.
- 5 La Figura 14B representa un gráfico que grafica el aumento porcentual en el ARNm de *Scn1a* en las dosis indicadas.
- La Figura 14C representa un gráfico que grafica el aumento porcentual en los niveles de proteína Nav1.1 en las 10 dosis indicadas.
- La Figura 15A representa un gráfico que grafica la disminución porcentual en la inclusión del exón 21x en las dosis indicadas.
- 15 La Figura 15B representa un gráfico que grafica el aumento porcentual en el ARNm de *Scn1a* en las dosis indicadas.
- La Figura 16 representa un ASO de direccionamiento a *Scn1a* seleccionado administrado en una dosis de 10 ug mediante inyección ICV en ratones del día 2 después del nacimiento evaluados el día 5 después de la inyección mediante Taqman qPCR de *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN4A*, *SCN5A*, *SCN7A*, *SCN8A*, *SCN9A*, *SCN10A* y *SCN11A* para evaluar la selectividad por la diana. Los resultados de amplificación por Taqman-qPCR normalizados con respecto a *Gapdh*, obtenidos mediante el uso de Ex20x+1 ASO, se grafican como cambio en veces con relación a los ratones inyectados con PBS.
- 20 La Figura 17 representa resultados ilustrativos de la inyección intracerebroventricular (ICV) en el día 2 después del nacimiento de un ASO seleccionado a la dosis indicada en ratones Dravet F1 de tipo silvestre (WT) o heterocigotos (HET) de cruces de 129S-*Scn1a*^{tm1Kea} × C57BL/6J 3 días después de la inyección.
- 25 La Figura 17A representa un gráfico de los resultados de un ensayo Taqman qPCR realizado mediante el uso de una sonda que abarca los exones 21 y 22. Los productos se normalizaron con respecto al control interno de *Gapdh* y se grafica el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los cerebros inyectados con PBS.
- 30 La Figura 17B representa un gráfico de los resultados de una transferencia Western realizada mediante el uso de un anticuerpo anti-Nav1.1. Los productos se normalizaron con respecto a bandas teñidas con Ponceau y se grafica el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los cerebros inyectados con PBS.
- 35 La Figura 18 representa los resultados ilustrativos de un microrrecorrido con ASO de la región del exón 20x de *SCN1A* en RenCells mediante absorción libre. Los ASO se diseñaron para cubrir regiones alrededor de tres ASO de dirección previamente identificados en la Figura 6 (marcados por estrellas) cambiando 1 nucleótido a la vez (6-41) o disminuyendo la longitud de ASO 17 (1-5). El gráfico representa el por ciento de inclusión del exón 20x medido mediante qPCR SYBR-verde. La línea negra indica que no hay cambios con respecto a ningún ASO (-).
- 40 La Figura 19 es un gráfico que grafica el aumento en el nivel de ARNm de *Scn1a* en cortes coronales de cerebro de ratones durante el tiempo posterior a la inyección de un ASO de direccionamiento a *SCN1A*. Como se muestra, el aumento en el nivel de ARNm de *Scn1a* se mantuvo durante al menos 80 días después de la inyección.
- 45 La Figura 20 es una curva de supervivencia ilustrativa que demuestra un beneficio de supervivencia del 100 % proporcionado por un ASO de direccionamiento a *SCN1A* en el modelo de ratón Dravet. +/- significa genotipo WT y +/- significa genotipo heterocigoto 129S-*scn1a*^{tm1Kea} (modelo de ratón Dravet); A significa tratamiento con PBS y B significa tratamiento con ASO. Como se muestra, los ratones en el grupo A +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con PBS) comenzaron a morir aproximadamente desde el día 16 después del nacimiento, mientras que todos los ratones de los otros tres grupos, incluido el grupo B +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con ASO), sobrevivieron hasta al menos el día 35 después del nacimiento.

45 Descripción detallada

Corte y empalme y descomposición del ARNm mediada por mutaciones sin sentido

- 50 Las secuencias intermedias o intrones son eliminados por un complejo de ARN-proteína grande y altamente dinámico denominado espliceosoma, que organiza interacciones complejas entre transcritos primarios, pequeños ARN nucleares (ARNpn) y una gran cantidad de proteínas. Los espliceosomas se ensamblan para esto en cada intrón de manera ordenada, comenzando con el reconocimiento del sitio de corte y empalme 5' (5'ss) por el ARNpn U1 o el sitio de corte y empalme 3' (3'ss) por la vía U2, que implica la unión del factor auxiliar U2 (U2AF) a la región 55 3'ss para facilitar la unión de U2 a la secuencia de punto de ramificación (BPS). U2AF es un heterodímero estable compuesto por una subunidad de 65 kD codificada por U2AF2 (U2AF65), que se une al tracto de polipirimidina (PPT), y una subunidad de 35 kD codificada por U2AF1 (U2AF35), que interactúa con dinucleótidos de AG altamente conservados en 3'ss y estabiliza la unión de U2AF65. Además de la unidad BPS/PPT y 3'ss/5'ss, un corte y empalme preciso requiere secuencias o estructuras auxiliares que activen o repriman el reconocimiento del sitio de corte y empalme, conocidas como potenciadores o silenciadores de corte y empalme intrónicos o exónicos. Estos 60 elementos permiten reconocer sitios de corte y empalme genuinos entre un gran exceso de sitios críticos o pseudositios en el genoma de eucariotas superiores, que tienen las mismas secuencias pero superan en número a los sitios auténticos en un orden de magnitud. Aunque frecuentemente tienen una función reguladora, los mecanismos exactos de su activación o represión no se conocen bien.

65 La decisión de cortar y empalmar o no cortar y empalmar puede modelarse típicamente como un proceso

estocástico en lugar de determinista, de manera que incluso las señales de corte y empalme más definidas a veces pueden cortar y empalmar incorrectamente. Sin embargo, en condiciones normales, el corte y empalme del preARNm se produce con una fidelidad sorprendentemente alta. Esto se atribuye en parte a la actividad de elementos reguladores de corte y empalme exónicos e intrónicos auxiliares que actúan en cis (ESR o ISR) adyacentes. Típicamente, estos elementos funcionales se clasifican como potenciadores de corte y empalme exónicos o intrónicos (ESE o ISE) o silenciadores (ESS o ISS) en función de su capacidad para estimular o inhibir el corte y empalme, respectivamente. Aunque ahora hay evidencia de que algunos elementos auxiliares que actúan en cis pueden actuar influyendo en la cinética del ensamblaje del espliceosoma, tal como la disposición del complejo entre U1 snRNP y 5'ss, parece muy probable que muchos elementos funcionen en concierto con proteínas de unión a ARN de acción trans (RBP). Por ejemplo, la familia de RBP rica en serina y arginina (proteínas SR) es una familia conservada de proteínas que tienen un papel clave en la definición de exones. Las proteínas SR promueven el reconocimiento de exones al reclutar componentes del prespliceosoma a sitios de corte y empalme adyacentes o al antagonizar los efectos de los ESS en los alrededores. Los efectos represivos de los ESS pueden estar mediados por miembros de la familia heterogénea de ribonucleoproteínas nucleares (hnRNP) y pueden alterar el reclutamiento de factores de corte y empalme centrales en sitios de corte y empalme adyacentes. Además de sus funciones en la regulación del corte y empalme, se sugiere que los elementos silenciadores desempeñan un papel en la represión de pseudoexones, conjuntos de sitios de corte y empalme intrónicos señalados con la separación típica de un exón pero sin un marco de lectura abierto funcional. Los ESE y ESS, en cooperación con sus RBP de acción trans afines, representan componentes importantes en un conjunto de controles de corte y empalme que especifican cómo, dónde y cuándo se ensamblan los ARNm a partir de sus precursores.

Las secuencias que marcan los límites exón-intrón son señales degeneradas de intensidad variable que pueden ocurrir con alta frecuencia dentro de los genes humanos. En genes de múltiples exones, diferentes pares de sitios de corte y empalme pueden unirse en muchas combinaciones diferentes, creando una serie diversa de transcritos a partir de un solo gen. Esto se conoce comúnmente como corte y empalme alternativo de preARNm. Aunque la mayoría de las isoformas de ARNm producidas mediante corte y empalme alternativo pueden exportarse desde el núcleo y traducirse en polipéptidos funcionales, diferentes isoformas de ARNm de un solo gen pueden variar mucho en su eficiencia de traducción. Es probable que aquellas isoformas de ARNm con codones de terminación prematura (PTC) al menos 50 pb aguas arriba de un complejo de unión exónica sean diana de degradación mediante la vía de descomposición de ARNm mediada por mutaciones sin sentido (NMD). Las mutaciones en los motivos de corte y empalme tradicionales (BPS/PPT/3'ss/5'ss) y auxiliares pueden provocar un corte y empalme aberrante, tal como la omisión de exones o la inclusión críptica (o pseudo) de exones o la activación del sitio de corte y empalme, y contribuir significativamente a la morbilidad y mortalidad humana. Tanto los patrones de corte y empalme aberrantes como los alternativos pueden verse influenciados por variantes naturales del ADN en exones e intrones.

Dado que los límites exón-intrón pueden producirse en cualquiera de las tres posiciones de un codón, está claro que sólo un subconjunto de eventos de corte y empalme alternativos pueden mantener el marco de lectura abierto canónico. Por ejemplo, sólo los exones que son divisibles uniformemente por 3 pueden omitirse o incluirse en el ARNm sin ninguna alteración del marco de lectura. Los eventos de corte y empalme que no tienen fases compatibles inducirán un desplazamiento de marco. A menos que los eventos aguas abajo los revertan, los desplazamientos de marco ciertamente pueden conducir a uno o más PTC, lo que probablemente es el resultado una degradación posterior por NMD. NMD es un mecanismo acoplado a la traducción que elimina los ARNm que contienen PTC. NMD puede funcionar como una vía de vigilancia que existe en todos los eucariotas. NMD puede reducir los errores en la expresión genética al eliminar los transcritos de ARNm que contienen codones de parada prematuros. La traducción de estos ARNm aberrantes podría, en algunos casos, conducir a una ganancia de función nociva o a una actividad dominante negativa de las proteínas resultantes. NMD se dirige no solo a transcritos con PTC sino también a una amplia gama de isoformas de ARNm expresadas a partir de muchos genes endógenos, lo que sugiere que NMD es un regulador maestro que impulsa ajustes tanto finos como gruesos en los niveles de ARN en estado estacionario en la célula.

Un exón inductor de NMD (NIE) es un exón o pseudoexón que se encuentra en una región dentro de un intrón y puede activar la vía NMD si se incluye en un transcrto de ARN maduro. En los eventos de corte y empalme constitutivos, el intrón que contiene un NIE generalmente se corta y empalma, pero el intrón o una porción del mismo (por ejemplo, NIE) puede retenerse durante eventos de corte y empalme alternativos o aberrantes. Los transcritos de ARNm maduro que contienen tal NIE pueden no ser productivos debido al desplazamiento de marco que induce la vía NMD. La inclusión de un NIE en transcritos de ARN maduro puede regular negativamente la expresión génica. Los transcritos de ARNm que contienen un NIE pueden denominarse "ARNm que contiene NIE" o "ARNm de exón NMD" en la descripción actual.

Los sitios crípticos (o pseudo corte y empalme) tienen las mismas secuencias de reconocimiento de corte y empalme que los sitios de corte y empalme genuinos, pero no se usan en las reacciones de corte y empalme. Superan en número a los sitios de corte y empalme genuinos en el genoma humano en un orden de magnitud y normalmente están reprimidos por mecanismos moleculares hasta ahora poco comprendidos. Los sitios de corte y empalme 5' crípticos tienen el NNN/GUNNNN o NNN/GCNNNN consenso donde N es cualquier nucleótido y / es el límite exón-intrón. Los sitios de corte y empalme 3' crípticos tienen el NAGN consenso. Su activación está influenciada positivamente por los nucleótidos circundantes que los hacen más similares al consenso óptimo de los

sitios de corte y empalme auténticos, específicamente, MAG/GURAGU y YAG/G, respectivamente, donde M es C o A, R es G o A e Y es C o U.

- 5 Los sitios de corte y empalme y sus secuencias reguladoras pueden identificarse fácilmente por un experto mediante el uso de algoritmos adecuados disponibles públicamente, enumerados, por ejemplo, en el documento de Kralovicova, J. y Vorechovsky, I. (2007) Global control of aberrant splice site activation by auxiliary splicing sequences: evidence for a gradient in exón and intron definition. Nucleic Acids Res., 35, 6399-6413,(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2095810/pdf/gkm680.pdf>)
- 10 Los sitios de corte y empalme crípticos o las secuencias reguladoras de corte y empalme pueden competir por proteínas de unión a ARN tal como U2AF con un sitio de corte y empalme del NIE. En un caso, un agente puede unirse al sitio de corte y empalme críptico o a las secuencias reguladoras de corte y empalme para evitar la unión de proteínas de unión a ARN y favorecer de esta manera la utilización de los sitios de corte y empalme de NIE.
- 15 En un caso, el sitio de corte y empalme críptico puede no comprender el sitio de corte y empalme 5' o 3' del NIE. El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 10 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 5' de NIE. El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 20 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 5' de NIE. El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 50 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 5' de NIE. El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 100 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 5' de NIE. El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 200 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 5' de NIE.
- 20
- 25 El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 10 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 3' de NIE. El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 20 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 3' de NIE. El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 50 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 3' de NIE. El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 100 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 3' de NIE. El sitio de corte y empalme críptico puede estar al menos 200 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 3' de NIE.
- 30 Transcritos diana
- 35 En algunos casos, los métodos de la presente descripción explotan la presencia de NIE en el preARNm transcrita del gen *SCN1A*. El corte y empalme de las especies de preARNm de NIE de *SCN1A* para producir ARNm de *SCN1A* maduro funcional puede inducirse mediante el uso de un agente terapéutico tal como un ASO que estimula la omisión de exones de un NIE. La inducción de la omisión de exones puede dar como resultado la inhibición de una vía NMD. El ARNm de *SCN1A* maduro resultante puede traducirse normalmente sin activar la vía NMD, aumentando de esta manera la cantidad de proteína *SCN1A* en las células del paciente y aliviando los síntomas de una afección asociada con la deficiencia de *SCN1A*, tal como el síndrome de Dravet (DS); epilepsia generalizada con convulsiones febres plus tipo 2; convulsiones febres, familiares, 3A; autismo; encefalopatía epiléptica infantil temprana, 13; síndrome del seno enfermo 1; enfermedad de Alzheimer; o SUDEP.
- 40
- 45 En diversos casos, la presente descripción proporciona un agente terapéutico que puede dirigirse a transcritos de ARNm de *SCN1A* para modular, por ejemplo, mejorar o inhibir, el corte y empalme o el nivel de expresión de proteínas. El agente terapéutico puede ser una molécula pequeña, un polinucleótido o un polipéptido. En algunos casos, el agente terapéutico es un ASO. Varias regiones o secuencias en el preARNm de *SCN1A* pueden ser dirigidas por un agente terapéutico, tal como un ASO. En algunos casos, el ASO se dirige a un transcripto de preARNm de *SCN1A* que contiene un NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia dentro de un NIE de un transcripto de preARNm de *SCN1A*. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia aguas arriba (o 5') del extremo 5' de un NIE (3'ss) de un transcripto de preARNm de *SCN1A*. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia aguas abajo (o 3') del extremo 3' de un NIE (5'ss) de un transcripto de preARNm de *SCN1A*. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia que se encuentra dentro de un intrón que flanquea el extremo 5' del NIE de un transcripto de preARNm de *SCN1A*. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia que se encuentra dentro de un intrón que flanquea el extremo 3' del NIE de un transcripto de preARNm de *SCN1A*. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia que comprende un límite NIE-intrón de un transcripto de preARNm de *SCN1A*. Un límite NIE-intrón puede referirse a la unión de una secuencia de intrón y una región NIE. La secuencia de intrones puede flanquear el extremo 5' del NIE o el extremo 3' del NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia dentro de un exón de un transcripto de preARNm de *SCN1A*. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia dentro de un intrón de un transcripto de preARNm de *SCN1A*. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia que comprende tanto una porción de un intrón como una porción de un exón.
- 50
- 55
- 60 En algunos casos, un agente terapéutico descrito en la presente descripción modula la unión de un factor implicado en el corte y empalme del ARNm del exón NMD.
- 65 En algunos casos, un agente terapéutico descrito en la presente descripción interfiere con la unión de un factor implicado en el corte y empalme del ARNm del exón NMD.

En algunos casos, un agente terapéutico descrito en la presente descripción previene la unión de un factor implicado en el corte y empalme del ARNm del exón NMD.

- 5 En algunos casos, un agente terapéutico se dirige a una porción diana localizada en una región intrónica entre dos regiones exónicas canónicas del ARNm del exón NMD que codifica SCN1A, y en donde la región intrónica contiene el exón NMD.
- 10 En algunos casos, un agente terapéutico se dirige a una porción diana que se solapa al menos parcialmente con el exón NMD.
- 15 En algunos casos, un agente terapéutico se dirige a una porción diana que se solapa al menos parcialmente con un intrón aguas arriba del exón NMD.
- 20 En algunos casos, un agente terapéutico se dirige a una porción específica dentro del exón NMD.
- 25 En algunos casos, un agente terapéutico se dirige a una porción diana que comprende al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos consecutivos del exón NMD. En algunos casos, un agente terapéutico se dirige a una porción diana que comprende a lo máximo aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos consecutivos del exón NMD. En algunos casos, un agente terapéutico se dirige a una porción diana que comprende aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos consecutivos del exón NMD.
- 30 En algunos casos, un agente terapéutico se dirige a una porción específica proximal al exón NMD.
- 35 En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos aguas arriba (o 5') del extremo 5' del NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 100 a aproximadamente 150 nucleótidos, aproximadamente 150 a aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 200 a aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 250 a aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 350 a aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 450 a aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 550 a aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 650 a aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 750 a aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 850 a aproximadamente 900 nucleótidos, aproximadamente 950 a aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 1050 a aproximadamente 1100 nucleótidos, aproximadamente 1150 a aproximadamente 1200 nucleótidos, aproximadamente 1250 a aproximadamente 1300 nucleótidos, aproximadamente 1350 a aproximadamente 1400 nucleótidos, o aproximadamente 1450 a aproximadamente 1500 nucleótidos aguas arriba (o 5') desde el extremo 5' de la región NIE. En algunos casos, el ASO puede dirigirse a una secuencia de más de 300 nucleótidos aguas arriba del extremo 5' del NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos aguas abajo (o 3') del extremo 3' del NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 100 a aproximadamente 150 nucleótidos, aproximadamente 150 a aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 200 a aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 250 a aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 350 a aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 450 a aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 550 a aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 650 a aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 750 a aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 850 a aproximadamente 900 nucleótidos, aproximadamente 950 a aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 1050 a aproximadamente 1100 nucleótidos, aproximadamente 1150 a aproximadamente 1200 nucleótidos, aproximadamente 1250 a aproximadamente 1300 nucleótidos, aproximadamente 1350 a aproximadamente 1400 nucleótidos, o aproximadamente 1450 a aproximadamente 1500 nucleótidos aguas abajo del extremo 3' del NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de más de 300 nucleótidos aguas abajo del extremo 3' del NIE.
- 55 En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos aguas arriba (o 5') del extremo 5' del NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de al menos aproximadamente 1 nucleótido, al menos aproximadamente 10 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, al menos aproximadamente 50 nucleótidos, al menos aproximadamente 80 nucleótidos, al menos aproximadamente 85 nucleótidos, al menos aproximadamente 90 nucleótidos, al menos aproximadamente 95 nucleótidos, al menos aproximadamente 96 nucleótidos, al menos aproximadamente 97 nucleótidos, al menos aproximadamente 98 nucleótidos, al menos aproximadamente 99 nucleótidos, al menos aproximadamente 100 nucleótidos, al menos aproximadamente 101 nucleótidos, al menos aproximadamente 102 nucleótidos, al menos aproximadamente 103 nucleótidos, al menos aproximadamente 104 nucleótidos, al menos aproximadamente 105 nucleótidos, al menos aproximadamente 110 nucleótidos, al menos aproximadamente 120 nucleótidos, al menos aproximadamente 150 nucleótidos, al menos aproximadamente 200 nucleótidos, al menos aproximadamente 300

nucleótidos, al menos aproximadamente 400 nucleótidos, al menos aproximadamente 500 nucleótidos, al menos aproximadamente 600 nucleótidos, al menos aproximadamente 700 nucleótidos, al menos aproximadamente 800 nucleótidos, al menos aproximadamente 900 nucleótidos o al menos aproximadamente 1000 nucleótidos aguas arriba (o 5') del extremo 5' de la región NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos aguas abajo (o 3') del extremo 3' del NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de al menos aproximadamente 1 nucleótido, al menos aproximadamente 10 nucleótidos, al menos aproximadamente 20 nucleótidos, al menos aproximadamente 50 nucleótidos, al menos aproximadamente 80 nucleótidos, al menos aproximadamente 85 nucleótidos, al menos aproximadamente 90 nucleótidos, al menos aproximadamente 95 nucleótidos, al menos aproximadamente 96 nucleótidos, al menos aproximadamente 97 nucleótidos, al menos aproximadamente 98 nucleótidos, al menos aproximadamente 99 nucleótidos, al menos aproximadamente 100 nucleótidos, al menos aproximadamente 101 nucleótidos, al menos aproximadamente 102 nucleótidos, al menos aproximadamente 103 nucleótidos, al menos aproximadamente 104 nucleótidos, al menos aproximadamente 105 nucleótidos, al menos aproximadamente 110 nucleótidos, al menos aproximadamente 120 nucleótidos, al menos aproximadamente 150 nucleótidos, al menos aproximadamente 200 nucleótidos, al menos aproximadamente 300 nucleótidos, al menos aproximadamente 400 nucleótidos, al menos aproximadamente 500 nucleótidos, al menos aproximadamente 600 nucleótidos, al menos aproximadamente 700 nucleótidos, al menos aproximadamente 800 nucleótidos, al menos aproximadamente 900 nucleótidos o al menos aproximadamente 1000 nucleótidos aguas abajo del extremo 3' del NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de más de 300 nucleótidos aguas abajo del extremo 3' del NIE.

En algunos casos, el NIE como se describe en la presente descripción se localiza entre GRCh37/hg19: chr2:166,863,740 y GRCh37/hg19: chr2:166,863,803, como se muestra en la Figura 2. En algunos casos, el extremo 5' del NIE se localiza en GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, el extremo 3' del NIE se localiza en GRCh37/hg19: chr2:166,863,740.

En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos aguas arriba (o 5') del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 100 a aproximadamente

- 150 nucleótidos, aproximadamente 150 a aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente 200 a
 5 aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 250 a aproximadamente 300, aproximadamente 250 a
 aproximadamente 300 nucleótidos, aproximadamente 350 a aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente
 10 450 a aproximadamente 500 nucleótidos, aproximadamente 550 a aproximadamente 600 nucleótidos,
 aproximadamente 650 a aproximadamente 700 nucleótidos, aproximadamente 750 a aproximadamente 800
 15 nucleótidos, aproximadamente de 850 a aproximadamente 900 nucleótidos, aproximadamente 950 a
 aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 1050 a aproximadamente 1100 nucleótidos,
 aproximadamente 1150 a aproximadamente 1200 nucleótidos, aproximadamente 1250 a aproximadamente 1300
 20 nucleótidos, aproximadamente 1350 a aproximadamente 1400 nucleótidos, o aproximadamente 1450 a
 aproximadamente 1500 nucleótidos aguas arriba (o 5') del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En
 25 algunos casos, el ASO puede dirigirse a una secuencia de más de 300 nucleótidos aguas arriba del sitio genómico
 GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a
 aproximadamente 300 nucleótidos aguas abajo (o 3') de GRCh37/hg19: chr2:166,863,740. En algunos casos, el
 30 ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 20 a
 aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nucleótidos, aproximadamente 100
 35 a aproximadamente 150 nucleótidos, aproximadamente 150 a aproximadamente 200 nucleótidos, aproximadamente
 200 a aproximadamente 250 nucleótidos, aproximadamente 250 a aproximadamente 300 nucleótidos,
 aproximadamente 350 a aproximadamente 400 nucleótidos, aproximadamente 450 a aproximadamente 500
 40 nucleótidos, aproximadamente 550 a aproximadamente 600 nucleótidos, aproximadamente 650 a aproximadamente
 700 nucleótidos, aproximadamente 750 a aproximadamente 800 nucleótidos, aproximadamente 850 a
 45 aproximadamente 900 nucleótidos, aproximadamente 950 a aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente
 1050 a aproximadamente 1100 nucleótidos, aproximadamente 1150 a aproximadamente 1200 nucleótidos,
 aproximadamente 1250 a aproximadamente 1300 nucleótidos, aproximadamente 1350 a aproximadamente 1400
 50 nucleótidos, o aproximadamente 1450 a aproximadamente 1500 nucleótidos aguas abajo de GRCh37/hg19: chr2:
 55 166,863,740. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de más de 300 nucleótidos aguas abajo de
 GRCh37/hg19: chr2:166,863,740.
- En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos
 60 aguas arriba (o 5') del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, el ASO se dirige a una
 secuencia de al menos aproximadamente 1 nucleótido, al menos aproximadamente 10 nucleótidos, al menos
 65 aproximadamente 20 nucleótidos, al menos aproximadamente 50 nucleótidos, al menos aproximadamente 80
 nucleótidos, al menos aproximadamente 85 nucleótidos, al menos aproximadamente 90 nucleótidos, al menos
 70 aproximadamente 95 nucleótidos, al menos aproximadamente 96 nucleótidos, al menos aproximadamente 97
 nucleótidos, al menos aproximadamente 98 nucleótidos, al menos aproximadamente 99 nucleótidos, al menos
 75 aproximadamente 100 nucleótidos, al menos aproximadamente 101 nucleótidos, al menos aproximadamente 102
 nucleótidos, al menos aproximadamente 103 nucleótidos, al menos aproximadamente 104 nucleótidos, al menos
 80 aproximadamente 105 nucleótidos, al menos aproximadamente 110 nucleótidos, al menos aproximadamente 120
 nucleótidos, al menos aproximadamente 150 nucleótidos, al menos aproximadamente 200 nucleótidos, al menos
 85 aproximadamente 300 nucleótidos, al menos aproximadamente 400 nucleótidos, al menos aproximadamente 500
 nucleótidos, al menos aproximadamente 600 nucleótidos, al menos aproximadamente 700 nucleótidos, al menos
 90 aproximadamente 800 nucleótidos, al menos aproximadamente 900 nucleótidos o al menos aproximadamente 1000
 nucleótidos aguas arriba (o 5') del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, el ASO se
 95 dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos aguas abajo (o 3') de
 GRCh37/hg19: chr2:166,863,740. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de al menos
 100 aproximadamente 1 nucleótido, al menos aproximadamente 10 nucleótidos, al menos aproximadamente 20
 nucleótidos, al menos aproximadamente 50 nucleótidos, al menos aproximadamente 80 nucleótidos, al menos
 105 aproximadamente 85 nucleótidos, al menos aproximadamente 90 nucleótidos, al menos aproximadamente 95
 nucleótidos, al menos aproximadamente 96 nucleótidos, al menos aproximadamente 97 nucleótidos, al menos
 110 aproximadamente 98 nucleótidos, al menos aproximadamente 99 nucleótidos, al menos aproximadamente 100
 nucleótidos, al menos aproximadamente 101 nucleótidos, al menos aproximadamente 102 nucleótidos, al menos
 115 aproximadamente 103 nucleótidos, al menos aproximadamente 104 nucleótidos, al menos aproximadamente 105
 nucleótidos, al menos aproximadamente 110 nucleótidos, al menos aproximadamente 120 nucleótidos, al menos
 120 aproximadamente 150 nucleótidos, al menos aproximadamente 200 nucleótidos, al menos aproximadamente 300
 nucleótidos, al menos aproximadamente 400 nucleótidos, al menos aproximadamente 500 nucleótidos, al menos
 125 aproximadamente 600 nucleótidos, al menos aproximadamente 700 nucleótidos, al menos aproximadamente 800
 nucleótidos, al menos aproximadamente 900 nucleótidos o al menos aproximadamente 1000 nucleótidos aguas
 130 abajo de GRCh37/hg19: chr2:166,863,740. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de más de 300
 nucleótidos aguas abajo de GRCh37/hg19: chr2:166,863,740.
- En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos
 135 aguas arriba (o 5') del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, el ASO se dirige a una
 secuencia de a lo máximo aproximadamente 10 nucleótidos, a lo máximo de aproximadamente 20 nucleótidos, a lo
 140 máximo aproximadamente 50 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 80 nucleótidos, a lo máximo
 145 aproximadamente 85 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 90 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 95
 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 96 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 97 nucleótidos, a lo
 150 máximo aproximadamente 98 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 99 nucleótidos, a lo máximo

aproximadamente 100 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 101 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 102 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 103 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 104 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 105 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 110 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 120 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 150 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 200 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 300 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 400 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 500 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 600 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 700 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 800 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 900 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1000 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1100 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1200 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1300 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1400 nucleótidos, o a lo máximo aproximadamente 1500 nucleótidos aguas arriba (o 5') del sitio genómico GRCh37/hg19: chr2:166,863,803. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos aguas abajo (o 3') de GRCh37/hg19: chr2:166,863,740. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de a lo máximo aproximadamente 10 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 20 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 50 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 80 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 85 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 90 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 95 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 96 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 97 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 98 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 99 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 100 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 101 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 102 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 103 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 104 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 105 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 110 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 120 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 150 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 200 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 300 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 400 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 500 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 600 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 700 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 800 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 900 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1000 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1100 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1200 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1300 nucleótidos, a lo máximo aproximadamente 1400 nucleótidos, o a lo máximo aproximadamente 1500 nucleótidos aguas abajo de GRCh37/hg19: chr2:166,863,740. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de más de 300 nucleótidos aguas abajo de GRCh37/hg19: chr2:166,863,740.

Como se describe en la presente descripción en los Ejemplos, el gen *SCN1A* (SEQ ID NO. 1) se analizó para NIE y se observó la inclusión de una porción del intrón 20 (SEQ ID NO. 4) (esta porción se denomina exón 20x en toda la presente descripción). En algunos casos, los ASO descritos en la presente descripción se dirigen a un preARNm que contiene NIE (SEQ ID NO. 2) transrito de una secuencia genómica de *SCN1A*. En algunos casos, el ASO se dirige a un transcripto de preARNm que contiene NIE de una secuencia genómica de *SCN1A* que comprende una porción del intrón 20. En algunos casos, el ASO se dirige a un transcripto de preARNm que contiene NIE de una secuencia genómica de *SCN1A* que comprende el exón 20x (SEQ ID NO. 6). En algunos casos, el ASO se dirige a un transcripto de preARNm que contiene NIE de SEQ ID NO. 2 o 12. En algunos casos, el ASO se dirige a un transcripto de preARNm que contiene NIE de SEQ ID NO. 2 o 12 que comprenden un NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a un transcripto de preARNm que contiene NIE de SEQ ID NO. 2 que comprende el exón 20x (SEQ ID NO. 10). En algunos casos, los ASO descritos en la presente descripción se dirigen a una secuencia de preARNm de *SCN1A* (SEQ ID NO. 2 o 12). En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de preARNm de *SCN1A* que comprende un NIE (SEQ ID NO. 10 o 20). En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de preARNm de *SCN1A* de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 7-10 o 17-20. En algunos casos, el ASO tiene una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 21-67. En algunos casos, el ASO tiene una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 68-114. En algunos casos, el ASO tiene una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 115-209. En algunos casos, el ASO tiene una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 210-256. En algunos casos, el ASO tiene una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 257-303. En algunos casos, el ASO tiene una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 304-341. En algunos casos, el ASO tiene una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 342-379.

En algunos casos, el transcripto de preARNm que contiene NIE de *SCN1A* está codificado por una secuencia genética con al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO.: 1 u 11. En algunos casos, el transcripto de preARNm de NIE de *SCN1A* comprende una secuencia con al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 2-10 y 12-20.

En algunos casos, el NIE de *SCN1A* que contiene transcripto de preARNm (o ARNm del exón NMD) comprende una secuencia con al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 y 17-20. En algunos casos, el transcripto de preARNm que contiene NIE de *SCN1A* (o ARNm del exón NMD) está codificado por una secuencia con al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 1, 3-6, 11 y 13-16. En algunos casos, la porción diana del ARNm del exón NMD comprende una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con una región que comprende al menos 8 ácidos nucleicos contiguos de la SEQ ID NO: 2, 7-10, 12 y 17-20.

- En algunos casos, el ASO se dirige al exón 20 de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que comprende el exón 20x de NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia del exón 21 aguas abajo (o 3') del exón 20x de NIE. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos aguas arriba (o 5') del extremo 5' del exón 20x. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 300 nucleótidos aguas abajo (o 3') del extremo 3' del exón 20x. En algunos casos, el ASO tiene una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 21-67. En algunos casos, el ASO tiene una secuencia de acuerdo con cualquiera de las SEQ ID NO: 210-256.
- En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia aguas arriba del extremo 5' de un NIE. Por ejemplo, los ASO que se dirigen a una secuencia aguas arriba del extremo 5' de un NIE (por ejemplo, exón 20x en *SCN1A* humano, o exón 21x en *SCN1A* de ratón) puede comprender una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 21-38. Para otro ejemplo, los ASO que se dirigen a una secuencia aguas arriba del extremo 5' de un NIE (por ejemplo, exón 20x en *SCN1A* humano, o exón 21x en *SCN1A* de ratón) puede comprender una secuencia con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 68-85. En algunos casos, los ASO se dirigen a una secuencia que contiene un límite (o unión) exón-intrón. Por ejemplo, los ASO que se dirigen a una secuencia que contiene un límite exón-intrón pueden comprender una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 39-41, 51, 52, 228-230, 240 o 241. Para otro ejemplo, los ASO que se dirigen a una secuencia que contiene un límite exón-intrón pueden comprender una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 86-88 y 98-99. En algunos casos, los ASO se dirigen a una secuencia aguas abajo del extremo 3' de un NIE. Por ejemplo, los ASO que se dirigen a una secuencia aguas abajo del extremo 3' de un NIE (por ejemplo, exón 20x en *SCN1A* humano, o exón 21x en *SCN1A* de ratón) puede comprender una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 53-67. Para otro ejemplo, los ASO que se dirigen a una secuencia aguas abajo del extremo 3' de un NIE (por ejemplo, exón 20x en *SCN1A* humano, o exón 21x en *SCN1A* de ratón) puede comprender una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 100-114. En algunos casos, los ASO se dirigen a una secuencia dentro de un NIE. Por ejemplo, los ASO que se dirigen a una secuencia dentro de un NIE (por ejemplo, exón 20x en *SCN1A* humano, o exón 21x en *SCN1A* de ratón) puede comprender una secuencia con al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 42-50 o 231-239. Para otro ejemplo, los ASO que se dirigen a una secuencia dentro de un NIE (por ejemplo, exón 20x en *SCN1A* humano, o exón 21x en *SCN1A* de ratón) puede comprender una secuencia con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 89-97.
- En algunos casos, el ASO se dirige al exón 20x en un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que comprende el exón 20x. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia del exón 20x aguas abajo (o 3') del extremo 5' del exón 20x de un preARNm de *SCN1A*. En algunos casos, el ASO se dirige a una secuencia del exón 20x aguas arriba (o 5') del extremo 3' del exón 20x de un preARNm de *SCN1A*.
- En algunos casos, la porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* se encuentra en el intrón 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 (numeración de intrones correspondiente a la secuencia de ARNm en NM_006920). En algunos casos, la hibridación de un ASO con la porción diana del preARNm de NIE da como resultado la omisión de exones de al menos uno de NIE dentro del intrón 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 y, subsecuentemente, aumenta la producción de proteína *SCN1A*. En algunos casos, la hibridación de un ASO con la porción diana del preARNm de NIE inhibe o bloquea la omisión de exones de al menos uno de NIE dentro del intrón 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 y, subsecuentemente, disminuye la producción de proteína *SCN1A*. En algunos casos, la porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* se encuentra en el intrón 20. Un experto en la técnica puede determinar el número de intrón correspondiente en cualquier isoforma basándose en una secuencia de intrones proporcionada en la presente descripción o mediante el uso del número proporcionado en referencia a la secuencia de ARNm en NM_006920, NM_001202435, NM_001165964 o NM_001165963. Un experto en la técnica también puede determinar las secuencias de exones flanqueantes en cualquier isoforma de *SCN1A* para el direccionamiento mediante el uso de los métodos de la descripción, basándose en una secuencia de intrones proporcionada en la presente descripción o mediante el uso del número de intrones proporcionado en referencia a la secuencia de ARNm en NM_006920, NM_001202435, NM_001165964 o NM_001165963.
- En algunos casos, los métodos y composiciones de la presente descripción se usan para modular, por ejemplo, aumentar o disminuir, la expresión de *SCN1A* al inducir o inhibir la omisión de exones de un pseudoexón de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A*. En algunos casos, el pseudoexón es una secuencia dentro de cualquiera de los intrones 1-25. En algunos casos, el pseudoexón es una secuencia dentro de cualquiera de los intrones 2, 4, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24 y 25. En algunos casos, el pseudoexón es una secuencia dentro de cualquiera de los intrones 15, 18 y 19. En algunos casos, el pseudoexón puede ser cualquier intrón de *SCN1A* o una porción del mismo. En algunos casos, el pseudoexón se encuentra dentro del intrón 20. La numeración del intrón de *SCN1A* usada en la presente descripción corresponde a la secuencia de ARNm en NM_006920. Se entiende que la numeración del intrón puede cambiar en referencia a una secuencia de isoforma de *SCN1A* diferente.

Proteína SCN1A

El gen *SCN1A* puede codificar la proteína SCN1A (canal de sodio, dependiente de voltaje, tipo I, subunidad alfa), que también puede denominarse subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje Nav1.1. También descritas anteriormente, las mutaciones de SCN1A en DS se extienden por toda la proteína. Se han identificado más de 100 mutaciones nuevas en todo el gen y las más debilitantes surgen de novo. Estos comprenden truncamientos (47 %), pérdida de sentido (43 %), eliminaciones (3 %) y mutaciones en el sitio de corte y empalme (7 %). El porcentaje de sujetos portadores de mutaciones de SCN1A varía entre el 33 y el 100 %. La mayoría de las mutaciones son cambios novedosos (88 %).

- En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción se usan para modular, por ejemplo, aumentar o disminuir, la producción de una proteína SCN1A funcional. Como se usa en la presente descripción, el término "funcional" se refiere a la cantidad de actividad o función de una proteína SCN1A que es necesaria para eliminar cualquiera de uno o más síntomas de una afección tratada, por ejemplo, síndrome de Dravet; epilepsia generalizada con convulsiones febris plus tipo 2; convulsiones febris, familiares, 3A; autismo; encefalopatía epiléptica infantil temprana, 13; síndrome del seno enfermo 1; enfermedad de Alzheimer; o SUDEP. En algunos casos, los métodos se usan para aumentar la producción de una proteína SCN1A parcialmente funcional. Como se usa en la presente descripción, la expresión "parcialmente funcional" se refiere a cualquier cantidad de actividad o función de la proteína SCN1A que sea menor que la cantidad de actividad o función que es necesaria para eliminar o prevenir cualquiera o más síntomas de una enfermedad o afección. En algunos casos, una proteína o ARN parcialmente funcional tendrá al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % menos de actividad con relación a la proteína o ARN completamente funcional.
- En algunos casos, el método es un método para aumentar la expresión de la proteína SCN1A por células de un sujeto que tiene un preARNm que contiene NIE que codifica la proteína SCN1A, en donde el sujeto tiene síndrome de Dravet provocado por una cantidad deficiente de actividad de la proteína SCN1A, y en donde la cantidad deficiente de la proteína SCN1A es provocada por una haploinsuficiencia de la proteína SCN1A. En tal caso, el sujeto tiene un primer alelo que codifica una proteína SCN1A funcional y un segundo alelo a partir del cual no se produce la proteína SCN1A. En otro de tales casos, el sujeto tiene un primer alelo que codifica una proteína SCN1A funcional y un segundo alelo que codifica una proteína SCN1A no funcional. En otro de tales casos, el sujeto tiene un primer alelo que codifica una proteína SCN1A funcional y un segundo alelo que codifica una proteína SCN1A parcialmente funcional. En cualquiera de estos casos, el oligómero antisentido se une a una porción diana del preARNm que contiene NIE transcrita a partir del segundo alelo, lo que induce de esta manera la omisión del exón del pseudoexón del preARNm y provoca un aumento en el nivel de ARNm maduro que codifica la proteína SCN1A funcional, y un aumento en la expresión de la proteína SCN1A en las células del sujeto.

En casos relacionados, el método es un método de uso de un ASO para aumentar la expresión de una proteína o ARN funcional. En algunos casos, se usa un ASO para aumentar la expresión de la proteína SCN1A en células de un sujeto que tiene un preARNm que contiene NIE que codifica la proteína SCN1A, en donde el sujeto tiene una deficiencia, por ejemplo, síndrome de Dravet (DS) (también conocido como SMEI); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI)-zona límite (SMEB); convulsión febril (FS); epilepsia generalizada con convulsiones febris plus (GEFS+); encefalopatía epiléptica infantil temprana, 13; epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclónico-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; encefalopatía mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epiléptica no clasificada; muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); síndrome del seno enfermo 1; encefalopatía SCN1A infantil temprana; encefalopatía epiléptica infantil temprana (EIEE); o autismo, en la cantidad o función de una proteína SCN1A. En algunos casos, se usa un ASO para aumentar la expresión de la proteína SCN1A en células de un sujeto, en donde el sujeto tiene una deficiencia, por ejemplo, encefalopatía epiléptica infantil temprana 13; en la cantidad o función de una proteína SCN8A. En algunos casos, se usa un ASO para aumentar la expresión de la proteína SCN1A en células de un sujeto, en donde el sujeto tiene una deficiencia, por ejemplo, síndrome del seno enfermo 1; en la cantidad o función de una proteína SCN5A.

En algunos casos, el NIE que contiene el transcripto de preARNm que codifica la proteína causante de la enfermedad o afección es la diana de los ASO descritos en la presente descripción. En algunos casos, los ASO se dirigen a un transcripto de preARNm que contiene NIE que codifica una proteína que no es causante de la enfermedad. Por ejemplo, una enfermedad que es el resultado de una mutación o deficiencia de una primera proteína en una vía particular puede mejorarse dirigiéndose a un preARNm que contiene NIE que codifica una segunda proteína, lo que aumenta de esta manera la producción de la segunda proteína. En algunos casos, la función de la segunda proteína es capaz de compensar la mutación o deficiencia de la primera proteína (que es la causante de la enfermedad o afección).

En algunos casos, el sujeto tiene:

- (a) un primer alelo mutante del cual

- (i) la proteína SCN1A se produce a un nivel reducido en comparación con la producción a partir de un alelo de tipo silvestre,
 (ii) la proteína SCN1A se produce en una forma que tiene una función reducida en comparación con una proteína de tipo silvestre equivalente, o
 5 (iii) no se produce la proteína SCN1A o el ARN funcional; y
- (b) un segundo alelo mutante del cual
- 10 (i) la proteína SCN1A se produce a un nivel reducido en comparación con la producción a partir de un alelo de tipo silvestre,
 (ii) la proteína SCN1A se produce en una forma que tiene una función reducida en comparación con una proteína de tipo silvestre equivalente, o
 (iii) la proteína SCN1A no se produce, y
- 15 en donde el preARNm que contiene NIE se transcribe a partir del primer alelo y/o del segundo alelo. En estos casos, el ASO se une a una porción diana del preARNm que contiene NIE transcrita a partir del primer alelo o del segundo alelo, lo que induce de esta manera la omisión del pseudoexón del preARNm que contiene NIE y lo que provoca un aumento en el nivel de ARNm que codifica la proteína SCN1A y un aumento en la expresión de la proteína diana o ARN funcional en las células del sujeto. En estos casos, la proteína diana o el ARN funcional que tiene un aumento 20 en el nivel de expresión que resulta de la omisión del exón del pseudoexón del preARNm que contiene NIE está en una forma que tiene una función reducida en comparación con la proteína de tipo silvestre equivalente (parcialmente funcional), o que tiene una función completa en comparación con la proteína de tipo silvestre equivalente (completamente funcional).
- 25 En algunos casos, el nivel de ARNm que codifica la proteína SCN1A aumenta de 1,1 a 10 veces, en comparación con la cantidad de ARNm que codifica la proteína SCN1A que se produce en una célula de control, por ejemplo, una que no se trata con el oligómero antisentido o una que se trata con un oligómero antisentido que no se une a la porción diana del preARNm que contiene NIE de SCN1A.
- 30 En algunos casos, un sujeto tratado mediante el uso de los métodos de la presente descripción expresa una proteína SCN1A parcialmente funcional a partir de un alelo, en donde la proteína SCN1A parcialmente funcional es provocada por una mutación de desplazamiento de marco, una mutación sin sentido, una mutación con pérdida de sentido o una eliminación parcial de un gen. En algunos casos, un sujeto tratado mediante el uso de los métodos de la descripción expresa una proteína SCN1A no funcional a partir de un alelo, en donde la proteína SCN1A no 35 funcional es provocada por una mutación de desplazamiento de marco, una mutación sin sentido, una mutación de pérdida de sentido, una eliminación parcial de un gen, en un alelo. En algunos casos, un sujeto tratado utilizando los métodos de la descripción tiene una SCN1A eliminación genética completa, en un alelo.
- 40 En algunos casos, el método es un método para disminuir la expresión de la proteína SCN1A por células de un sujeto que tiene un preARNm que contiene NIE que codifica la proteína SCN1A, y en donde el sujeto tiene una mutación de ganancia de función en Nav1.1. En tal caso, el sujeto tiene un alelo a partir del cual se produce la proteína SCN1A en una cantidad elevada o un alelo que codifica una SCN1A mutante que induce una mayor actividad de Nav1.1 en la célula. En algunos casos, el aumento de la actividad de Nav1.1 se caracteriza por una corriente de sodio prolongada o casi persistente mediada por el canal Nav1.1 mutante, una desaceleración de la 45 inactivación rápida, un cambio positivo en la inactivación en estado estacionario, una mayor disponibilidad del canal durante la estimulación repetitiva, un aumento de las corrientes de sodio persistentes inducidas por la despolarización no inactivada, una entrada retardada en la inactivación, una recuperación acelerada de una inactivación rápida y/o rescate de defectos de plegamiento mediante incubación a temperatura más baja o coexpresión de proteínas de interacción. En cualquiera de estos casos, el oligómero antisentido se une a una 50 porción diana del preARNm que contiene NIE transcrita a partir del segundo alelo, al inhibir o bloquear de esta manera la omisión del pseudoexón del preARNm y al provocar una disminución en el nivel de ARNm maduro que codifica la proteína SCN1A funcional, y una disminución en la expresión de la proteína SCN1A en las células del sujeto.
- 55 En casos relacionados, el método es un método para usar un ASO para disminuir la expresión de una proteína o ARN funcional. En algunos casos, se usa un ASO para disminuir la expresión de la proteína SCN1A en células de un sujeto que tiene un preARNm que contiene NIE que codifica la proteína SCN1A. En algunos casos, el sujeto tiene una mutación de ganancia de función en Nav1.1, por ejemplo, migraña. En algunos casos, se usa un ASO para disminuir la expresión de la proteína SCN1A en células de un sujeto, el sujeto tiene una mutación de ganancia de función en Nav1.1, por ejemplo, migraña, hemipléjico familiar, 3.
- 60 En algunos casos, el nivel de ARNm que codifica la proteína SCN1A disminuye de 1,1 a 10 veces, en comparación con la cantidad de ARNm que codifica la proteína SCN1A que se produce en una célula de control, por ejemplo, uno que no se trata con el oligómero antisentido o uno que se trata con un oligómero antisentido que no se une a la porción diana del preARNm que contiene NIE de SCN1A.

- En algunos casos, un sujeto tratado mediante el uso de los métodos de la presente descripción expresa una proteína SCN1A mutante de un alelo, en donde la proteína SCN1A mutante es provocada por una mutación de desplazamiento de marco, una mutación sin sentido, una mutación de pérdida de sentido o una eliminación parcial de un gen, y en donde la proteína SCN1A mutante provoca un nivel de actividad elevado de Nav1.1. En algunos 5 casos, un sujeto tratado mediante el uso de los métodos de la presente descripción expresa una cantidad elevada de proteína SCN1A a partir de un alelo debido a una mutación de desplazamiento de marco, una mutación sin sentido, una mutación de pérdida de sentido o una eliminación parcial de un gen.
- 10 En los casos de la presente descripción, un sujeto puede tener una mutación en *SCN1A*. Las mutaciones en *SCN1A* puede propagarse a lo largo de dicho gen. La proteína SCN1A puede consistir en cuatro dominios. Dichos dominios SCN1A pueden tener segmentos transmembrana. Pueden surgir mutaciones en dicha proteína SCN1A a lo largo de dicha proteína. Dicha proteína SCN1A puede consistir en al menos dos isoformas. Las mutaciones en SCN1A pueden comprender R931C, R946C, M934I, R1648C o R1648H. En algunos casos, pueden observarse mutaciones en el extremo C de una proteína SCN1A. También pueden encontrarse mutaciones en una proteína SCN1A en lazos entre los segmentos 5 y 6 de los tres primeros dominios de dicha proteína SCN1A. En algunos casos, pueden observarse mutaciones en el extremo N de una proteína SCN1A. Las mutaciones ilustrativas dentro de SCN1A incluyen, pero no se limitan a, R222X, R712X, I227S, R1892X, W952X, R1245X, R1407X, W1434R, c.4338+1G>A, S1516X, L1670fsX1678 o K1846fsX1856. Las mutaciones que pueden ser dianas también pueden codificar un poro de un canal iónico.
- 15 20 En algunos casos, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar el síndrome de Down. En otros casos, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar la epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI). En otros casos, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar el síndrome de Dravet límite; epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus tipo 2; convulsiones febriles, familiares, 3A; migraña, hemipléjica familiar, 3; autismo; encefalopatía epiléptica infantil temprana, 13; síndrome del seno enfermo 1; enfermedad de Alzheimer o SUDEP. Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción también pueden usarse para tratar SMEI límite. Además, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar la epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+). GEFS+ puede estar asociada con mutaciones en subunidades 25 de canales iónicos asociadas a la epilepsia, tal como SCN1B o GABRG2. Los métodos y composiciones descritos en la presente descripción también pueden usarse para tratar canalopatías de sodio. Las canalopatías del sodio pueden estar asociadas con mutaciones en SCN1A. Las canalopatías de sodio también pueden estar asociadas con subunidades de SCN1A, tal como la subunidad beta, SCN1B. En algunos casos, con la presente descripción 30 también pueden tratarse enfermedades adicionales asociadas con mutaciones en SCN1A. Las enfermedades de SCN1A relacionadas asociadas con mutaciones en SCN1A incluyen, pero son limitarse a, miotonía congénita atípica, parálisis periódica hipertonásica y paramiotonía congénita.
- 35 40 En algunos casos, un sujeto que tiene cualquier mutación en SCN1A conocida en la técnica y descrita en la bibliografía mencionada anteriormente (por ejemplo, por Hamdan, y otros, 2009, Mulley, y otros, 2005) puede tratarse mediante el uso de los métodos y composiciones descritos en la presente descripción. En algunos casos, la mutación se encuentra dentro de cualquier intrón o exón de *SCN1A*.
- Inclusión de exones
- 45 50 Como se usa en la presente descripción, un "preARNm que contiene NIE" es un transcripto de preARNm que contiene al menos un pseudoexón. El corte y empalme alternativo o aberrante puede dar como resultado la inclusión de al menos un pseudoexón en los transcriptos de ARNm maduro. Los términos "ARNm maduro" y "ARNm completamente empalmado" se usan indistintamente en la presente descripción para describir un ARNm completamente procesado. La inclusión de al menos un pseudoexón puede ser un ARNm no productivo y conducir a NMD del ARNm maduro. El NIE que contiene ARNm maduro a veces puede conducir a una expresión aberrante de proteínas.
- 55 60 En algunos casos, el pseudoexón incluido es el pseudoexón más abundante en una población de preARNm que contiene NIE transcrita a partir del gen que codifica la proteína diana en una célula. En algunos casos, el pseudoexón incluido es el pseudoexón más abundante en una población de preARNm que contiene NIE transcritos a partir del gen que codifica la proteína diana en una célula, en donde la población de preARNm que contiene NIE comprende dos o más incluye pseudoexones. En algunos casos, un oligómero antisentido dirigido al pseudoexón más abundante en la población de preARNm que contienen NIE que codifican la proteína diana induce la omisión de uno o dos o más pseudoexones en la población, incluido el pseudoexón para al que se dirige o se une el oligómero antisentido. En algunos casos, la región diana se encuentra en un pseudoexón que es el pseudoexón más abundante en un preARNm que contiene NIE que codifica la proteína SCN1A.
- 65 El grado de inclusión de exones puede expresarse como por ciento de inclusión de exones, por ejemplo, el porcentaje de transcriptos en los que se incluye un pseudoexón determinado. En resumen, el por ciento de inclusión de exones puede calcularse como el porcentaje de la cantidad de transcriptos de ARN con inclusión de exones, sobre la suma del promedio de la cantidad de transcriptos de ARN con inclusión de exones más el promedio de la cantidad

de transcritos de ARN con exclusión de exones.

En algunos casos, poner en contacto células con un ASO que es complementario a una porción diana de un transcripto de preARNm de *SCN1A* da como resultado un aumento en la cantidad de proteína SCN1A producida en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 1000 %, en comparación con la cantidad de la proteína producida por una célula en ausencia de ASO/ausencia de tratamiento. En algunos casos, la cantidad total de proteína SCN1A producida por la célula con la que se pone en contacto el oligómero antisentido aumenta en aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 8 veces.

aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, menos aproximadamente 1,1 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en comparación con la cantidad de proteína diana producida por un compuesto de control. Un compuesto de control puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido que no es complementario a una porción diana del preARNm.

En algunos casos, poner en contacto células con un ASO que es complementario a una porción diana de un transcripto de preARNm de *SCN1A* da como resultado una disminución en la cantidad de proteína SCN1A producida en al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 1000 %, en comparación con la cantidad de la proteína producida por una célula en ausencia de ASO/ausencia de tratamiento. En algunos casos, la cantidad total de proteína SCN1A producida por la célula con la que se pone en contacto el oligómero antisentido disminuye en aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, menos aproximadamente 1,1 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en comparación con la cantidad de proteína diana producida por un compuesto de control. Un compuesto de control puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido que no es complementario a una porción diana del preARNm.

En algunos casos, poner en contacto células con un ASO que es complementario a una porción diana de un transcripto de preARNm de *SCN1A* da como resultado un aumento en la cantidad de ARNm que codifica SCN1A, incluido el ARNm maduro que codifica la proteína diana. En algunos casos, la cantidad de ARNm que codifica la proteína SCN1A, o el ARNm maduro que codifica la proteína SCN1A, aumenta al menos en 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 1000 %, en comparación con la cantidad de proteína producida por una célula en ausencia de ASO/ausencia de tratamiento. En algunos casos, la cantidad total del ARNm que codifica la proteína SCN1A, o el ARNm maduro que codifica la proteína SCN1A producido en la célula con la que se pone en contacto el oligómero antisentido aumenta en aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, menos aproximadamente 1,1 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, en comparación con la cantidad de proteína diana producida por un compuesto de control. Un compuesto de control puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido que no es complementario a una porción diana del preARNm que contiene NIE de SCN1A.

En algunos casos, poner en contacto células con un ASO que es complementario a una porción diana de un transcripto de preARNm de *SCN1A* da como resultado una disminución en la cantidad de ARNm que codifica SCN1A, incluido el ARNm maduro que codifica la proteína diana. En algunos casos, la cantidad de ARNm que codifica la proteína SCN1A, o el ARNm maduro que codifica la proteína SCN1A, disminuye al menos en 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o 1000 %, en comparación con la cantidad de proteína producida por una célula en ausencia de ASO/ausencia de tratamiento. En algunos casos, la cantidad total del ARNm que codifica la proteína SCN1A, o el ARNm maduro que codifica la proteína SCN1A producido en la célula con la que se pone en contacto el oligómero antisentido disminuye en aproximadamente 1,1 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 10 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 10 veces,

aproximadamente 1,1 a aproximadamente 5 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 6 veces,
 5 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 1,1 a aproximadamente 8 veces,
 aproximadamente 1,1 a aproximadamente 9 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces,
 aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces,
 aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces,
 10 aproximadamente 3 a aproximadamente 6 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 7 veces,
 aproximadamente 3 a aproximadamente 8 veces, aproximadamente 3 a aproximadamente 9 veces,
 aproximadamente 4 a aproximadamente 7 veces, aproximadamente 4 a aproximadamente 8 veces,
 aproximadamente 4 a aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 1, 1 veces, al menos
 15 aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos
 aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos
 aproximadamente 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces en comparación con la cantidad de ARN maduro
 producido en una célula no tratada, por ejemplo, una célula no tratada o una célula tratada con un compuesto de
 control. Un compuesto de control puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido que no es complementario a una
 porción diana del preARNm que contiene NIE de SCN1A.

El NIE puede tener cualquier longitud. En algunos casos, el NIE comprende una secuencia completa de un intrón, en
 20 cuyo caso puede denominarse retención de intrón. En algunos casos, el NIE puede ser una porción del intrón. En
 algunos casos, el NIE puede ser una porción del extremo 5' de un intrón que incluye una secuencia 5'ss. En algunos
 25 casos, el NIE puede ser una porción del extremo 3' de un intrón que incluye una secuencia 3'ss. En algunos casos,
 el NIE puede ser una porción dentro de un intrón sin la inclusión de una secuencia 5'ss. En algunos casos, el NIE
 puede ser una porción dentro de un intrón sin la inclusión de una secuencia 3'ss. En algunos casos, el NIE puede
 tener 5 nucleótidos a 10 nucleótidos de longitud, 10 nucleótidos a 15 nucleótidos de longitud, 15 nucleótidos a 20
 30 nucleótidos de longitud, 20 nucleótidos a 25 nucleótidos de longitud, 25 nucleótidos a 30 nucleótidos de longitud, 30
 nucleótidos a 35 nucleótidos de longitud, 35 nucleótidos a 40 nucleótidos de longitud, 40 nucleótidos a 45
 nucleótidos de longitud, 45 nucleótidos a 50 nucleótidos de longitud, 50 nucleótidos a 55 nucleótidos de longitud, 55
 nucleótidos a 60 nucleótidos de longitud, 60 nucleótidos a 65 nucleótidos de longitud, 65 nucleótidos a 70
 35 nucleótidos de longitud, 70 nucleótidos a 75 nucleótidos de longitud, 75 nucleótidos a 80 nucleótidos de longitud, 80
 nucleótidos a 85 nucleótidos de longitud, 85 nucleótidos a 90 nucleótidos de longitud, 90 nucleótidos a 95
 nucleótidos de longitud o 95 nucleótidos a 100 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el NIE puede tener al
 menos 10 nucleótidos, al menos 20 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, al menos 40 nucleótidos, al menos 50
 nucleótidos, al menos 60 nucleótidos, al menos 70 nucleótidos, al menos 80 nucleótidos de longitud, al menos 90
 nucleótidos, o al menos 100 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el NIE puede tener de 100 a 200 nucleótidos
 40 de longitud, de 200 a 300 nucleótidos de longitud, de 300 a 400 nucleótidos de longitud, de 400 a 500 nucleótidos de
 longitud, de 500 a 600 nucleótidos de longitud, de 600 a 700 nucleótidos de longitud, de 700 a 800 nucleótidos de
 longitud, de 800 a 900 nucleótidos de longitud, de 900 a 1000 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el NIE
 45 puede tener más de 1000 nucleótidos de longitud.

La inclusión de un pseudoexón puede provocar un desplazamiento de marco y la introducción de un codón de
 50 terminación prematura (PIC) en el transcripto de ARNm maduro, lo que convierte al transcripto en una diana de NMD.
 El transcripto de ARNm maduro que contiene NIE puede ser un transcripto de ARNm no productivo que no conduce a
 la expresión de proteínas. El PIC puede estar presente en cualquier posición aguas abajo de un NIE. En algunos
 55 casos, el PIC puede estar presente en cualquier exón aguas abajo de un NIE. En algunos casos, el PIC puede estar
 presente dentro del NIE. Por ejemplo, la inclusión del exón 20x en un transcripto de ARNm codificado por el gen
 SCN1A puede inducir un PIC en el transcripto de ARNm, por ejemplo, un PIC en el exón 21 del transcripto de ARNm.

Agentes terapéuticos

En diversos casos de la presente descripción, se proporcionan composiciones y métodos que comprenden un
 50 agente terapéutico para modular el nivel de expresión de proteínas de SCN1A. En algunos casos, en la presente
 descripción se proporcionan composiciones y métodos para modular el corte y empalme alternativo de preARNm de
 SCN1A. En algunos casos, en la presente descripción se proporcionan composiciones y métodos para inducir la
 55 omisión de exones en el corte y empalme del preARNm de SCN1A, por ejemplo, para inducir la omisión de un
 pseudoexón durante el corte y empalme del preARNm de SCN1A. En otros casos, pueden usarse agentes
 terapéuticos para inducir la inclusión de un exón para de disminuir el nivel de expresión de la proteína.

En algunos casos, un agente terapéutico descrito en la presente descripción es una molécula pequeña, un
 60 polipéptido o un polímero de ácido polinucleico. En algunos casos, el agente terapéutico es una molécula pequeña.
 En algunos casos, el agente terapéutico es un polipéptido. En algunos casos, el agente terapéutico es un polímero
 de ácido polinucleico. En algunos casos, el agente terapéutico es un agente represor. En casos adicionales, el
 agente terapéutico es un agente potenciador.

Un agente terapéutico descrito en la presente descripción puede ser un agente represor de NIE. Un agente
 65 terapéutico puede comprender un polímero de ácido polinucleico.

- De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, en la presente descripción se proporciona un método de tratamiento o prevención de una afección asociada con una deficiencia de proteína SCN1A funcional, que comprende administrar un agente represor de NIE a un sujeto para aumentar los niveles de proteína SCN1A funcional, en donde el agente se une a una región del transcripto de preARNm para disminuir la inclusión del NIE en el transcripto maduro. Por ejemplo, en la presente descripción se proporciona un método de tratamiento o prevención de una afección asociada con una deficiencia de la proteína SCN1A funcional, que comprende administrar un agente represor de NIE a un sujeto para aumentar los niveles de la proteína SCN1A funcional, en donde el agente se une a una región de una intrón que contiene un NIE (por ejemplo, intrón 20 en el gen SCN1A humano) del transcripto de preARNm o a una secuencia reguladora activadora de NIE en el mismo intrón.
- Cuando se hace referencia a reducir la inclusión de NIE en el ARNm maduro, la reducción puede ser completa, por ejemplo, 100 %, o puede ser parcial. La reducción puede ser clínicamente significativa. La reducción/corrección puede ser con relación al nivel de inclusión de NIE en el sujeto sin tratamiento, o con relación a la cantidad de inclusión de NIE en una población de sujetos similares. La reducción/corrección puede ser al menos 10 % menos de inclusión de NIE con relación al sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. La reducción puede ser al menos 20 % menos de inclusión de NIE con relación a un sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. La reducción puede ser al menos 40 % menos de inclusión de NIE con relación a un sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. La reducción puede ser al menos 50 % menos de inclusión de NIE con relación a un sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. La reducción puede ser al menos 60 % menos de inclusión de NIE con relación a un sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. La reducción puede ser al menos 80 % menos de inclusión de NIE con relación a un sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. La reducción puede ser al menos 90 % menos de inclusión de NIE con relación a un sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento.
- Cuando se hace referencia al aumento de los niveles de proteína SCN1A activa, el aumento puede ser clínicamente significativo. El aumento puede ser con relación al nivel de proteína SCN1A activa en el sujeto sin tratamiento, o con relación a la cantidad de proteína SCN1A activa en una población de sujetos similares. El aumento puede ser al menos 10 % más de proteína SCN1A activa con relación al sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. El aumento puede ser al menos 20 % más de proteína SCN1A activa con relación al sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. El aumento puede ser al menos 40 % más de proteína SCN1A activa con relación al sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. El aumento puede ser al menos 50 % más de proteína SCN1A activa con relación al sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. El aumento puede ser al menos 80 % más de proteína SCN1A activa con relación al sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. El aumento puede ser al menos 100 % más de proteína SCN1A activa con relación al sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. El aumento puede ser al menos 200 % más de proteína SCN1A activa con relación al sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento. El aumento puede ser al menos 500 % más de proteína SCN1A activa con relación al sujeto promedio, o el sujeto antes del tratamiento.
- En los casos en donde el agente represor de NIE comprende un polímero de ácido polinucleico, el polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 45 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 35 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 24 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 19 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 18 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 17 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 16 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 15 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 14 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 13 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 12 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 11 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 10 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 10 y aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 10 y aproximadamente 45 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 10 y aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 10 y aproximadamente 35 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 10 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 10 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 10 y aproximadamente 20 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 15 y aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. El polímero de ácido polinucleico puede tener aproximadamente 12 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.
- La secuencia del polímero de ácido polinucleico puede ser al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % complementario a una secuencia diana

de un transcripto de ARNm, por ejemplo, un transcripto de ARNm parcialmente procesado. La secuencia del polímero de ácido polinucleico puede ser 100 % complementaria a una secuencia diana de un transcripto de preARNm.

5 La secuencia del polímero de ácido polinucleico puede tener 4 o menos coincidencias erróneas con una secuencia diana del transcripto de preARNm. La secuencia del polímero de ácido polinucleico puede tener 3 o menos coincidencias erróneas con una secuencia diana del transcripto de preARNm. La secuencia del polímero de ácido polinucleico puede tener 2 o menos coincidencias erróneas con una secuencia diana del transcripto de preARNm. La secuencia del polímero de ácido polinucleico puede tener 1 o menos coincidencias erróneas con una secuencia diana del transcripto de preARNm. La secuencia del polímero de ácido polinucleico puede no tener coincidencias erróneas con una secuencia diana del transcripto de preARNm.

10
15 El polímero de ácido polinucleico puede hibridarse específicamente con una secuencia diana del transcripto de preARNm. Por ejemplo, el polímero de ácido polinucleico puede tener 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 % o 100 % de complementariedad de secuencia con una secuencia diana del transcripto de preARNm. La hibridación puede realizarse en condiciones de hibridación muy estrictas.

20
25 El polímero de ácido polinucleico puede tener una secuencia con al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21-67. El polímero de ácido polinucleico puede tener una secuencia con 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21-67. En algunos casos, el polímero de ácido polinucleico puede tener una secuencia con al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,5 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 68-114. En algunos casos, el polímero de ácido polinucleico puede tener una secuencia con 100 % de identidad de secuencia con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 68-114.

30
35 Cuando se hace referencia a una secuencia de polímero de ácido polinucleico, el experto entenderá que pueden tolerarse una o más sustituciones, opcionalmente pueden tolerarse dos sustituciones en la secuencia, de manera que mantenga la capacidad de hibridarse con la secuencia diana; o cuando la sustitución es en una secuencia diana, la capacidad de ser reconocida como la secuencia diana. Las referencias a la identidad de la secuencia pueden determinarse mediante la alineación de la secuencia BLAST mediante el uso de parámetros estándar/predeterminados. Por ejemplo, la secuencia puede tener 99 % de identidad y seguir funcionando de acuerdo con la presente descripción. En otros casos, la secuencia puede tener 98 % de identidad y seguir funcionando de acuerdo con la presente descripción. En otro caso, la secuencia puede tener 95 % de identidad y aún funcionar de acuerdo con la presente descripción. En otro caso, la secuencia puede tener 90 % de identidad y aún funcionar de acuerdo con la presente descripción.

Oligómeros antisentido

40 En la presente descripción se proporciona una composición que comprende un oligómero antisentido que induce la omisión de exones mediante la unión a una porción diana de un preARNm que contiene NIE de SCN1A. Como se usan en la presente descripción, los términos "ASO" y "oligómero antisentido" se usan indistintamente y se refieren a un oligómero tal como un polinucleótido, que comprende nucleobases que se hibridan con una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, un preARNm que contiene NIE de SCN1A) mediante emparejamiento de bases Watson-Crick o emparejamiento de bases oscilantes (G-U). El ASO puede tener una secuencia exacta complementaria a la secuencia diana o casi complementaria (por ejemplo, complementariedad suficiente para unirse a la secuencia diana y mejorar el corte y empalme en un sitio de corte y empalme). Los ASO están diseñados para que se unan (hibriden) a un ácido nucleico diana (por ejemplo, una porción diana de un transcripto de preARNm) y permanezcan hibridados en condiciones fisiológicas. Típicamente, si se hibridan con un sitio distinto de la secuencia de ácido nucleico prevista (diana), se hibridan con un número limitado de secuencias que no son un ácido nucleico diana (con unos pocos sitios distintos de un ácido nucleico diana). El diseño de un ASO puede tener en cuenta la aparición de la secuencia de ácido nucleico de la porción diana del transcripto de preARNm o una secuencia de ácido nucleico suficientemente similar en otras localizaciones en el genoma o preARNm o transcriptoma celular, de manera que es limitada la posibilidad de que el ASO se una a otros sitios y provoque efectos "fuera de la diana".
55 Cualquier oligómero antisentido conocido en la técnica, por ejemplo en la solicitud PCT núm. PCT/US2014/054151, publicado como WO 2015/035091, titulado "Reducing Nonsense-Mediated mRNA Decay", puede usarse para practicar los métodos descritos en la presente descripción.

60 En algunos casos, los ASO "se hibridan específicamente" o son "específicos" a un ácido nucleico diana o una porción diana de un preARNm que contiene NIE. Típicamente, tal hibridación se produce con una T_m sustancialmente mayor que 37 °C, preferentemente al menos 50 °C, y típicamente entre 60 °C y aproximadamente 90 °C. Una hibridación de este tipo corresponde preferentemente a condiciones de hibridación estrictas. A una fuerza iónica y un pH dados, la T_m es la temperatura a la que el 50 % de una secuencia diana se hibrida con un oligonucleótido complementario.
65

Los oligómeros, tales como los oligonucleótidos, son "complementarios" entre sí cuando la hibridación se produce en

- una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos monocatenarios. Un polinucleótido de doble hebra puede ser "complementario" a otro polinucleótido, si puede producirse hibridación entre una de las hebras del primer polinucleótido y el segundo. La complementariedad (el grado en el que un polinucleótido es complementario con otro) es cuantificable en términos de relación (por ejemplo, el porcentaje) de bases en hebras opuestas que se espera que formen enlaces de hidrógeno entre sí, de acuerdo con reglas de emparejamiento de bases generalmente aceptadas. No es necesario que la secuencia de un oligómero antisentido (ASO) sea 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana a hibridar. En determinados casos, los ASO pueden comprender al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99 % de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácido nucleico diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un ASO en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto oligomérico son complementarios a una región diana y, por lo tanto, se hibridarían específicamente, representaría un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí ni con nucleobases complementarias. El por ciento de complementariedad de un ASO con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse de forma rutinaria mediante el uso de programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineación local) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (documentos, Altschul, y otros, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656).
- No es necesario que un ASO se hibride con todas las nucleobases en una secuencia diana y las nucleobases con las que se hibrida pueden ser contiguas o no contiguas. Los ASO pueden hibridarse sobre uno o más segmentos de un transcripto de preARNm, de manera que los segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el evento de hibridación por ejemplo, puede formarse una estructura de lazo o de horquilla). En ciertos casos, un ASO se hibrida con nucleobases no contiguas en un transcripto de preARNm diana. Por ejemplo, un ASO puede hibridarse con nucleobases en un transcripto de preARNm que están separados por una o más nucleobases con las que el ASO no se hibrida.
- Los ASO descritos en la presente descripción comprenden nucleobases que son complementarias a las nucleobases presentes en una porción específica de un preARNm que contiene NIE. El término ASO abarca oligonucleótidos y cualquier otra molécula oligomérica que comprenda nucleobases capaces de hibridarse con una nucleobase complementaria en un ARNm diana pero que no comprenda un resto de azúcar, tal como un ácido nucleico peptídico (PNA). Los ASO pueden comprender nucleótidos naturales, análogos de nucleótidos, nucleótidos modificados o cualquier combinación de dos o tres de los anteriores. La expresión "nucleótidos de origen natural" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión "nucleótidos modificados" incluye nucleótidos con grupos de azúcares modificados o sustituidos y/o que tienen una cadena principal modificada. En algunos casos, todos los nucleótidos del ASO son nucleótidos modificados. Las modificaciones químicas de los ASO o componentes de los ASO que son compatibles con los métodos y composiciones descritas en la presente descripción serán evidentes para un experto en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos patente de Estados Unidos núm. 8,258,109 B2, patente de Estados Unidos núm. 5,656,612, publicación de patente de Estados Unidos núm. 2012/0190728, y Dias y Stein, Mol. Cancer Ther. 2002, 347-355.
- Una o más nucleobases de un ASO pueden ser cualquier nucleobase no modificada de origen natural tal como adenina, guanina, citosina, timina y uracilo, o cualquier nucleobase sintética o modificada que sea suficientemente similar a una nucleobase no modificada de manera que sea capaz de formar enlaces de hidrógeno con una nucleobase presente en un preARNm diana. Ejemplos de nucleobases modificadas incluyen, sin limitación, hipoxantina, xantina, 7-metilguanina, 5,6-dihidrouracilo, 5-metilcitosina y 5-hidroximetoilcitosina.
- Los ASO descritos en la presente descripción también comprenden una estructura de cadena principal que conecta los componentes de un oligómero. Las expresiones "estructura de cadena principal" y "enlaces oligoméricos" pueden usarse indistintamente y se refieren a la conexión entre monómeros del ASO. En los oligonucleótidos de origen natural, la cadena principal comprende un enlace fosfodiéster 3'-5' que conecta restos de azúcar del oligómero. La estructura de cadena principal o los enlaces oligoméricos de los ASO descritos en la presente descripción pueden incluir (pero no se limitan a) fosforotioato, fosforoditioato, fosforodiselenato, fosforoaniloftiato, fosforaniladato, fosforamidato y similares. Ver, por ejemplo los documentos, LaPlanche, y otros, Nucleic Acids Res. 14:9081 (1986); Stec, y otros, J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein, y otros, Nucleic Acids Res. 16:3209 (1988), Zon, y otros, Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon, y otros, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec, y otros, patente de Estados Unidos núm. 5,151,510; Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90:543 (1990). En algunos casos, la estructura de cadena principal del ASO no contiene fósforo, sino enlaces peptídicos, por ejemplo en un ácido nucleico peptídico (PNA), o grupos de enlace que incluyen carbamato, amidas y grupos hidrocarbonados lineales y cílicos. En algunos casos, la modificación de la cadena principal es un enlace fosfotioato. En algunos casos, la modificación de la cadena principal es un enlace fosforamidato.
- En algunos casos, la estereoquímica en cada uno de los enlaces internucleótídicos de fósforo de la cadena principal de ASO es aleatoria. En algunos casos, la estereoquímica en cada uno de los enlaces internucleótídicos de fósforo de la cadena principal de ASO está controlada y no es aleatoria. Por ejemplo, la patente de los Estados Unidos de solicitud de Estados Unidos núm. 2014/0194610, "Methods for the Synthesis of Functionalized Nucleic Acids",

incorporado en la presente descripción como referencia, describe métodos para seleccionar independientemente la lateralidad de la quiralidad en cada átomo de fósforo en un oligómero de ácido nucleico. En los casos, un ASO usado en los métodos de la descripción, incluido cualquiera de los ASO expuestos en la presente descripción en las Tablas 5 y 6, comprende un ASO que tiene enlaces internucleotídicos de fósforo que no son aleatorios. En algunos casos, una composición usada en los métodos de la descripción comprende un ASO diastereomérico puro. En casos, una composición usada en los métodos de la descripción comprende un ASO que tiene pureza diastereomérica de al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 91 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 92 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 93 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 94 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 96 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 97 % a aproximadamente 100 %, aproximadamente 98 % a aproximadamente 100 % o aproximadamente 99 % a aproximadamente 100 %.

En casos, el ASO tiene una mezcla no aleatoria de configuraciones Rp y Sp en sus enlaces internucleotídicos de fósforo. Por ejemplo, se ha sugerido que se requiere una mezcla de Rp y Sp en los oligonucleótidos antisentido para lograr un equilibrio entre una buena actividad y la estabilidad de nucleasas (documento de Wan, y otros, 2014, "Synthesis, biophysical properties and biological activity of second generation antisense oligonucleotides containing chiral phosphorothioate linkages," Nucleic Acids Research 42(22): 13456-13468, incorporado en la presente descripción como referencia). En casos, un ASO usado en los métodos de descripción, incluido cualquiera de los ASO expuestos en la presente descripción en las SEQ ID NO: 21-114, comprende aproximadamente 5-100 % de Rp, al menos aproximadamente 5 % de Rp, al menos aproximadamente 10 % de Rp, al menos aproximadamente 15 % de Rp, al menos aproximadamente 20 % de Rp, al menos aproximadamente 25 % de Rp, al menos aproximadamente 30 % de Rp, al menos aproximadamente 35 % de Rp, al menos aproximadamente 40 % de Rp, al menos aproximadamente 45 % de Rp, al menos aproximadamente 50 % de Rp, al menos aproximadamente 55 % de Rp, al menos aproximadamente 60 % de Rp, al menos aproximadamente 65 % de Rp, al menos aproximadamente 70 % de Rp, al menos aproximadamente 75 % de Rp, al menos aproximadamente 80 % de Rp, al menos aproximadamente 85 % de Rp, al menos aproximadamente 90 % de Rp, o al menos aproximadamente 95 % de Rp, y el resto Sp, o aproximadamente 100 % de Rp. En casos, un ASO usado en los métodos de descripción, incluido cualquiera de los ASO expuestos en la presente descripción en las SEQ ID NO: 21-114, comprende aproximadamente 10 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 15 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 20 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 25 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 30 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 35 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 40 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 45 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 55 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 60 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 65 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 75 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 85 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 % de Rp, aproximadamente 20 % a aproximadamente 80 % de Rp, aproximadamente 25 % a aproximadamente 75 % de Rp, aproximadamente 30 % a aproximadamente 70 % de Rp, aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 % de Rp, o aproximadamente 45 % a aproximadamente 55 % de Rp, y el resto Sp.

En casos, un ASO usado en los métodos de descripción, incluido cualquiera de los ASO expuestos en la presente descripción en las SEQ ID NO: 21-114, comprende aproximadamente 5-100 % de Sp, al menos aproximadamente 5 % de Sp, al menos aproximadamente 10 % de Sp, al menos aproximadamente 15 % de Sp, al menos aproximadamente 20 % de Sp, al menos aproximadamente 25 % de Sp, al menos aproximadamente 30 % de Sp, al menos aproximadamente 35 % de Sp, al menos aproximadamente 40 % de Sp, al menos aproximadamente 45 % de Sp, al menos aproximadamente 50 % de Sp, al menos aproximadamente 55 % de Sp, al menos aproximadamente 60 % de Sp, al menos aproximadamente 65 % de Sp, al menos aproximadamente 70 % de Sp, al menos aproximadamente 75 % de Sp, al menos aproximadamente 80 % de Sp, al menos aproximadamente 85 % de Sp, al menos aproximadamente 90 % de Sp, o al menos aproximadamente 95 % de Sp, y el resto Rp, o aproximadamente 100 % de Sp. En casos, un ASO usado en los métodos de descripción, incluido cualquiera de los ASO expuestos en la presente descripción en las SEQ ID NO: 21-114, comprende aproximadamente 10 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 15 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 20 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 25 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 30 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 35 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 40 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 45 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 55 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 60 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 65 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 70 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 75 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 80 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 85 % a aproximadamente 100 % de Sp, aproximadamente 90 % a aproximadamente 100 % de Sp, o aproximadamente 95 % a aproximadamente 100 % de Sp.

de Sp, aproximadamente 20 % a aproximadamente 80 % de Sp, aproximadamente 25 % a aproximadamente 75 % de Sp, aproximadamente 30 % a aproximadamente 70 % de Sp, aproximadamente 40 % a aproximadamente 60 % de Sp, o aproximadamente 45 % a aproximadamente 55 % de Sp, y el resto Rp.

- 5 Cualquiera de los ASO descritos en la presente descripción puede contener un resto de azúcar que comprende ribosa o desoxirribosa, como está presente en los nucleótidos de origen natural, o un resto de azúcar modificado o un análogo de azúcar, incluido un anillo de morfolina. Los ejemplos no limitantes de restos de azúcar modificados incluyen sustituciones 2' tales como 2'-O-metilo (2'-O-Me), 2'-O-metoxietilo (2'MOE), 2'-O-aminoetilo, 2' F; fosforamidato de N3'->P5', 2'dimetilaminooxietoxi, 2'dimetilaminoetoxietoxi, 2'-guanidinidio, 2'-O-guanidinio etilo, azúcares modificados con carbamato y azúcares modificados bicíclicos. En algunos casos, la modificación del resto de azúcar se selecciona de 2'-O-Me, 2'F y 2'MOE. En algunos casos, la modificación del resto de azúcar es un enlace puente adicional, tal como en un ácido nucleico bloqueado (LNA). En algunos casos, el análogo del azúcar contiene un anillo morfolino, tal como fosforodiamidato morfolino (PMO). En algunos casos, el resto de azúcar comprende una modificación de ribofuransilo o 2'desoxirribofuransilo. En algunos casos, el resto de azúcar comprende modificaciones de 2'O-metiloxietilo (cMOE) restringidas en 2'4'. En algunos casos, el resto de azúcar comprende modificaciones de 2'-O etil BNA restringidas en cEt 2', 4'. En algunos casos, el resto de azúcar comprende modificaciones de tricicloADN (tcADN). En algunos casos, el resto de azúcar comprende modificaciones de ácido nucleico de etileno (ENA). En algunos casos, el resto de azúcar comprende modificaciones de MCE. Las modificaciones son conocidas en la técnica y se describen en la bibliografía, por ejemplo, por Jarver, y otros, 2014, en el documento "A Chemical View of Oligonucleotides for Exon Skipping and Related Drug Applications," Nucleic Acid Therapeutics 24(1): 37-47.

En algunos casos, cada monómero del ASO se modifica de la misma manera, por ejemplo, cada enlace de la cadena principal del ASO comprende un enlace fosforotioato o cada resto de azúcar ribosa comprende una modificación 2'O-metilo. Estas modificaciones que están presentes en cada uno de los componentes monoméricos de un ASO se denominan "modificaciones uniformes". En algunos ejemplos, puede desearse una combinación de diferentes modificaciones, por ejemplo, un ASO puede comprender una combinación de enlaces fosforodiamidato y restos de azúcar que comprenden anillos de morfolina (morpholinos). Las combinaciones de diferentes modificaciones de un ASO se denominan "modificaciones mixtas" o "químicas mixtas".

30 En algunos casos, el ASO comprende una o más modificaciones de la cadena principal. En algunos casos, el ASO comprende una o más modificaciones de restos de azúcar. En algunos casos, el ASO comprende una o más modificaciones de la cadena principal y una o más modificaciones de restos de azúcar. En algunos casos, el ASO comprende una modificación 2'MOE y una cadena principal de fosforotioato. En algunos casos, el ASO comprende un fosforodiamidato morfolino (PMO). En algunos casos, el ASO comprende un ácido nucleico peptídico (PNA). Cualquier de los ASO o cualquier componente de un ASO (por ejemplo, una nucleobase, un resto de azúcar, una cadena principal) descritos en la presente descripción pueden modificarse para lograr las propiedades o actividades deseadas del ASO o reducir las propiedades o actividades no deseadas del ASO. Por ejemplo, puede modificarse un ASO o uno o más componentes de cualquier ASO para mejorar la afinidad de unión a una secuencia diana en un transcríto de preARNm; reducir la unión a cualquier secuencia no diana; reducir la degradación por nucleasas celulares (es decir, ARNasa H); mejorar la absorción del ASO en una célula y/o en el núcleo de una célula; alterar la farmacocinética o farmacodinamia del ASO; y/o modular la vida media del ASO.

45 En algunos casos, los ASO están compuestos por nucleótidos modificados con fosforotioato de 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE). Los ASO compuestos por tales nucleótidos son especialmente adecuados para los métodos descritos en la presente descripción; se ha demostrado que los oligómeros que tienen tales modificaciones tienen una resistencia significativamente mejorada a la degradación de nucleasas y una mayor biodisponibilidad, lo que los hace adecuados, por ejemplo, para suministro oral en algunos casos descritos en la presente descripción. Ver por ejemplo los documentos, Geary, y otros, J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3):890-7; Geary, y otros, J Pharmacol Exp Ther. 2001; 296(3):898-904.

50 Los expertos en la técnica conocerán los métodos para sintetizar los ASO. Como alternativa o además, los ASO pueden obtenerse de una fuente comercial.

55 A menos que se especifique de cualquier otra manera, el extremo izquierdo de las secuencias de ácido nucleico de cadena única (por ejemplo, transcríto de preARNm, oligonucleótido, ASO, etc.) es el extremo 5' y la dirección hacia la izquierda de las secuencias de ácido nucleico de hebra doble o única se denomina la dirección 5'. De manera similar, el extremo o dirección hacia la derecha de una secuencia de ácido nucleico (monocatenaria o bicatenaria) es el extremo o dirección 3'. Generalmente, una región o secuencia que está en 5' con respecto a un punto de referencia en un ácido nucleico se denomina "aguas arriba", y una región o secuencia que está en 3' con respecto a un punto de referencia en un ácido nucleico se denomina "aguas abajo". Generalmente, la dirección o extremo 5' de un ARNm es donde se localiza el codón de iniciación o de inicio, mientras que el extremo o dirección 3' es donde se localiza el codón de terminación. En algunos aspectos, los nucleótidos que se encuentran aguas arriba de un punto de referencia en un ácido nucleico pueden designarse mediante un número negativo, mientras que los nucleótidos que se encuentran aguas abajo de un punto de referencia pueden designarse mediante un número positivo. Por ejemplo, un punto de referencia (por ejemplo, una unión exón-exón en ARNm) puede designarse como el sitio

"cero", y un nucleótido que se encuentra directamente adyacente y aguas arriba del punto de referencia se puede designar "menos uno", por ejemplo, "-1", mientras que un nucleótido que se encuentra directamente adyacente y aguas abajo del punto de referencia se denomina "más uno", por ejemplo, "+1."

- 5 En algunos casos, los ASO son complementarios (y se unen a) una porción específica de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra aguas abajo (en la dirección 3') del sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3' del NIE) del exón incluido en un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* (por ejemplo, la dirección designada por números positivos en relación con el sitio de corte y empalme 5'). En algunos casos, los ASO son complementarios a una porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra dentro de la región de aproximadamente +1 a aproximadamente +500 con relación al sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3') del exón incluido. En algunos casos, los ASO pueden ser complementarios de una porción diana de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra dentro de la región entre los nucleótidos +6 y +496 en relación con el sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3') del exón incluido. En algunos aspectos, los ASO son complementarios a una porción diana que se encuentra dentro de la región aproximadamente +1 a aproximadamente +500, aproximadamente +1 a aproximadamente +490, aproximadamente +1 a aproximadamente +480, aproximadamente +1 a aproximadamente +470, aproximadamente +1 a aproximadamente +460, aproximadamente +1 a aproximadamente +450, aproximadamente +1 a aproximadamente +440, aproximadamente +1 a aproximadamente +430, aproximadamente +1 a aproximadamente +420, aproximadamente +1 a aproximadamente +410, aproximadamente +1 a aproximadamente +400, aproximadamente +1 a aproximadamente +390, aproximadamente +1 a aproximadamente +380, aproximadamente +1 a aproximadamente +370, aproximadamente +1 a aproximadamente +360, aproximadamente +1 a aproximadamente +350, aproximadamente +1 a aproximadamente +340, aproximadamente +1 a aproximadamente +330, aproximadamente +1 a aproximadamente +320, aproximadamente +1 a aproximadamente +310, aproximadamente +1 a aproximadamente +300, aproximadamente +1 a aproximadamente +290, aproximadamente +1 a aproximadamente +280, aproximadamente +1 a aproximadamente +270, aproximadamente +1 a aproximadamente +260, aproximadamente +1 a aproximadamente +250, aproximadamente +1 a aproximadamente +240, aproximadamente +1 a aproximadamente +230, aproximadamente +1 a aproximadamente +220, aproximadamente +1 a aproximadamente +210, aproximadamente +1 a aproximadamente +200, aproximadamente +1 a aproximadamente +190, aproximadamente +1 a aproximadamente +180, aproximadamente +1 a aproximadamente +170, aproximadamente +1 a aproximadamente +160, aproximadamente +1 a aproximadamente +150, aproximadamente +1 a aproximadamente +140, aproximadamente +1 a aproximadamente +130, aproximadamente +1 a aproximadamente +120, aproximadamente +1 a aproximadamente +110, aproximadamente +1 a aproximadamente +100, aproximadamente +1 a aproximadamente +90, aproximadamente +1 a aproximadamente +80, aproximadamente +1 a aproximadamente +70, aproximadamente +1 a aproximadamente +60, aproximadamente +1 a aproximadamente +50, aproximadamente +1 a aproximadamente +40, aproximadamente +1 a aproximadamente +30, o aproximadamente +1 a aproximadamente +20 con relación al sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3') del exón incluido. En algunos aspectos, los ASO son complementarios a una porción diana que se encuentra dentro de la región de aproximadamente +1 a aproximadamente +100, de aproximadamente +100 a aproximadamente +200, de aproximadamente +200 a aproximadamente +300, de aproximadamente +300 a aproximadamente +400, o de aproximadamente +400 a aproximadamente +500 con relación al sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3') del exón incluido.

- En algunos casos, los ASO son complementarios (y se unen a) una porción diana de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra aguas arriba (en la dirección 5') del sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3') del exón incluido en un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* (por ejemplo, la dirección designada por números negativos con relación al sitio de corte y empalme 5'). En algunos casos, los ASO son complementarios a una porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra dentro de la región aproximadamente -4 a aproximadamente -270 con relación al sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3') del exón incluido. En algunos casos, los ASO pueden ser complementarios de una porción diana de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra dentro de la región entre los nucleótidos -1 y -264 con relación al sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3') del exón incluido. En algunos aspectos, los ASO son complementarios a una porción diana que se encuentra dentro de la región aproximadamente -1 a aproximadamente -270, aproximadamente -1 a aproximadamente -260, aproximadamente -1 a aproximadamente -250, aproximadamente -1 a aproximadamente -240, aproximadamente -1 a aproximadamente -230, aproximadamente -1 a aproximadamente -220, aproximadamente -1 a aproximadamente -210, aproximadamente -1 a aproximadamente -200, aproximadamente -1 a aproximadamente -190, aproximadamente -1 a aproximadamente -180, aproximadamente -1 a aproximadamente -170, aproximadamente -1 a aproximadamente -160, aproximadamente -1 a aproximadamente -150, aproximadamente -1 a aproximadamente -140, aproximadamente -1 a aproximadamente -130, aproximadamente -1 a aproximadamente -120, aproximadamente -1 a aproximadamente -110, aproximadamente -1 a aproximadamente -100, aproximadamente -1 a aproximadamente -90, aproximadamente -1 a aproximadamente -80, aproximadamente -1 a aproximadamente -70, aproximadamente -1 a aproximadamente -60, aproximadamente -1 a aproximadamente -50, aproximadamente -1 a aproximadamente -40, aproximadamente -1 a aproximadamente -30, o aproximadamente -1 a aproximadamente -20 con relación al sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3') del exón incluido. En algunos aspectos, los ASO son complementarios a una porción diana que se encuentra dentro de la región de aproximadamente -1 a aproximadamente -50, de aproximadamente -50 a aproximadamente -100, de aproximadamente -100 a aproximadamente -150, de aproximadamente -150 a aproximadamente -200, o de

aproximadamente -200 a aproximadamente -250 con relación al sitio de corte y empalme 5' (o extremo 3') del exón incluido.

- 5 En algunos casos, los ASO son complementarios a una región diana de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra aguas arriba (en la dirección 5') del sitio de corte y empalme 3' (o extremo 5') del exón incluido en un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* (por ejemplo, en la dirección designada por números negativos). En algunos casos, los ASO son complementarios a una porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra dentro de la región aproximadamente -1 a aproximadamente -500 con relación al sitio de corte y empalme 3' (o extremo 5') del exón incluido. En algunos casos, los ASO son complementarios a una porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra dentro de la región -1 a -496 con relación al sitio de corte y empalme 3' del exón incluido. En algunos aspectos, los ASO son complementarios a una porción diana que se encuentra dentro de la región aproximadamente -1 a aproximadamente -500, aproximadamente -1 a aproximadamente -490, aproximadamente -1 a aproximadamente -480, aproximadamente -1 a aproximadamente -470, aproximadamente -1 a aproximadamente -460, aproximadamente -1 a aproximadamente -450, aproximadamente -1 a aproximadamente -440, aproximadamente -1 a aproximadamente -430, aproximadamente -1 a aproximadamente -420, aproximadamente -1 a aproximadamente -410, aproximadamente -1 a aproximadamente -400, aproximadamente -1 a aproximadamente -390, aproximadamente -1 a aproximadamente -380, aproximadamente -1 a aproximadamente -370, aproximadamente -1 a aproximadamente -360, aproximadamente -1 a aproximadamente -350, aproximadamente -1 a aproximadamente -340, aproximadamente -1 a aproximadamente -330, aproximadamente -1 a aproximadamente -320, aproximadamente -1 a aproximadamente -310, aproximadamente -1 a aproximadamente -300, aproximadamente -1 a aproximadamente -290, aproximadamente -1 a aproximadamente -280, aproximadamente -1 a aproximadamente -270, aproximadamente -1 a aproximadamente -260, aproximadamente -1 a aproximadamente -250, aproximadamente -1 a aproximadamente -240, aproximadamente -1 a aproximadamente -230, aproximadamente -1 a aproximadamente -220, aproximadamente -1 a aproximadamente -210, aproximadamente -1 a aproximadamente -200, aproximadamente -1 a aproximadamente -190, aproximadamente -1 a aproximadamente -180, aproximadamente -1 a aproximadamente -170, aproximadamente -1 a aproximadamente -160, aproximadamente -1 a aproximadamente -150, aproximadamente -1 a aproximadamente -140, aproximadamente -1 a aproximadamente -130, aproximadamente -1 a aproximadamente -120, aproximadamente -1 a aproximadamente -110, aproximadamente -1 a aproximadamente -100, aproximadamente -1 a aproximadamente -90, aproximadamente -1 a aproximadamente -80, aproximadamente -1 a aproximadamente -70, aproximadamente -1 a aproximadamente -60, aproximadamente -1 a aproximadamente -50, aproximadamente -1 a aproximadamente -40, o aproximadamente -1 a aproximadamente -30 con relación al sitio de corte y empalme 3' del exón incluido. En algunos aspectos, los ASO son complementarios a una porción diana que se encuentra dentro de la región de aproximadamente -1 a aproximadamente -100, de aproximadamente -100 a aproximadamente -200, de aproximadamente -200 a aproximadamente -300, de aproximadamente -300 a aproximadamente -400, o de aproximadamente -400 a aproximadamente -500 con relación al sitio de corte y empalme 3' del exón incluido.
- 40 En algunos casos, los ASO son complementarios a una región diana de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra aguas abajo (en la dirección 3') del sitio de corte y empalme 3' (extremo 5') del exón incluido en un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* (por ejemplo, en la dirección designada por números positivos). En algunos casos, los ASO son complementarios a una porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* que se encuentra dentro de la región de aproximadamente +1 a aproximadamente +100 con relación al sitio de corte y empalme 3' del exón incluido. En algunos aspectos, los ASO son complementarios a una porción diana que se encuentra dentro de la región aproximadamente +1 a aproximadamente +90, aproximadamente +1 a aproximadamente +80, aproximadamente +1 a aproximadamente +70, aproximadamente +1 a aproximadamente +60, aproximadamente +1 a aproximadamente +50, aproximadamente +1 a aproximadamente +40, aproximadamente +1 a aproximadamente +30, aproximadamente +1 a aproximadamente +20, o aproximadamente +1 a aproximadamente +10 con relación al sitio de corte y empalme 3' del exón incluido.
- 50 En algunos casos, la porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* se encuentra dentro de la región + 100 con relación al sitio de corte y empalme 5' (extremo 3') del exón incluido a -100 con relación al sitio de corte y empalme 3' (extremo 5') del exón incluido. En algunos casos, la porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* se encuentra dentro del NIE. En algunos casos, la porción diana del preARNm que contiene NIE de *SCN1A* comprende un límite de pseudoexón e intrón.
- 60 Los ASO pueden tener cualquier longitud adecuada para una unión específica y una mejora efectiva del corte y empalme. En algunos casos, los ASO consisten en 8 a 50 nucleobases. Por ejemplo, el ASO puede ser 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 40, 45 o 50 nucleobases de longitud. En algunos casos, los ASO consisten en más de 50 nucleobases. En algunos casos, el ASO es de 8 a 50 nucleobases, 8 a 40 nucleobases, 8 a 35 nucleobases, 8 a 30 nucleobases, 8 a 25 nucleobases, 8 a 20 nucleobases, 8 a 15 nucleobases, 9 a 50 nucleobases, 9 a 40 nucleobases, 9 a 35 nucleobases, 9 a 30 nucleobases, 9 a 25 nucleobases, 9 a 20 nucleobases, 9 a 15 nucleobases, 10 a 50 nucleobases, 10 a 40 nucleobases, 10 a 35 nucleobases, 10 a 30 nucleobases, 10 a 25 nucleobases, 10 a 20 nucleobases, 10 a 15 nucleobases, 11 a 50 nucleobases, 11 a 40 nucleobases, 11 a 35 nucleobases, 11 a 30 nucleobases, 11 a 25 nucleobases, 11 a 20 nucleobases, 11 a 15 nucleobases, 12 a 50 nucleobases, 12 a 40 nucleobases, 12 a 35

- nucleobases, 12 a 30 nucleobases, 12 a 25 nucleobases, 12 a 20 nucleobases, 12 a 15 nucleobases, 13 a 50 nucleobases, 13 a 40 nucleobases, 13 a 35 nucleobases, 13 a 30 nucleobases, 13 a 25 nucleobases, 13 a 20 nucleobases, 14 a 50 nucleobases, 14 a 40 nucleobases, 14 a 35 nucleobases, 14 a 30 nucleobases, 14 a 25 nucleobases, 14 a 20 nucleobases, 15 a 50 nucleobases, 15 a 40 nucleobases, 15 a 35 nucleobases, 15 a 30 nucleobases, 15 a 25 nucleobases, 15 a 20 nucleobases, 20 a 50 nucleobases, 20 a 40 nucleobases, 20 a 35 nucleobases, 20 a 30 nucleobases, 20 a 25 nucleobases, 25 a 50 nucleobases, 25 a 40 nucleobases, 25 a 35 nucleobases o 25 a 30 nucleobases de longitud. En algunos casos, los ASO tienen 18 nucleótidos de longitud. En algunos casos, los ASO tienen 15 nucleótidos de longitud. En algunos casos, los ASO tienen 25 nucleótidos de longitud.
- En algunos casos, se usan dos o más ASO con químicas diferentes pero complementarios a la misma porción diana del preARNm que contiene NIE. En algunos casos, se usan dos o más ASO que son complementarios a diferentes porciones dianas del preARNm que contiene NIE.
- En los casos, los oligonucleótidos antisentido de la descripción están unidos químicamente a uno o más restos o conjugados, por ejemplo, un resto de direccionamiento u otro conjugado que mejora la actividad o la absorción celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen, pero sin limitarse a, un resto lipídico, por ejemplo, como un resto de colesterol, un resto de colesterilo, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético. En la bibliografía publicada se han descrito oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos y métodos de preparación. En algunos casos, el oligonucleótido antisentido se conjuga con un resto que incluye, pero sin limitarse a, un nucleótido abásico, un políéter, una poliamina, una poliamida, un péptido, un carbohidrato, por ejemplo, N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-Ac-Glucosamina (GluNAc) o manosa (por ejemplo, manosa-6-fosfato), un lípido o un compuesto de polihidrocarburo. Los conjugados pueden unirse a uno o más de cualquier nucleótido que comprenda el oligonucleótido antisentido en cualquiera de varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato, como se entiende en la técnica y se describe en la bibliografía, por ejemplo, mediante el uso de un enlazador. Los enlazadores pueden incluir un enlazador ramificado bivalente o trivalente. En algunos casos, el conjugado se une al extremo 3' del oligonucleótido antisentido. Se describen métodos para preparar conjugados de oligonucleótidos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 8,450,467, "Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides".
- En algunos casos, el ácido nucleico al que se dirigirá un ASO es un preARNm que contiene NIE de *SCN1A* expresado en una célula, tal como una célula eucariota. En algunos casos, el término "célula" puede referirse a una población de células. En algunos casos, la célula está en un sujeto. En algunos casos, la célula se aísla de un sujeto. En algunos casos, la célula diana se encuentra *ex vivo*. En algunos casos, la célula es una célula o línea celular relevante para una afección o enfermedad. En algunos casos, la célula se encuentra *in vitro* (por ejemplo, en cultivo celular).

Composiciones farmacéuticas

- Las composiciones o formulaciones farmacéuticas que comprenden el agente, por ejemplo, oligonucleótido antisentido, de las composiciones descritas y para uso en cualquiera de los métodos descritos pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica y descritas en la bibliografía publicada. En algunos casos, una composición o formulación farmacéutica para tratar a un sujeto comprende una cantidad eficaz de cualquier oligómero antisentido como se describe en la presente descripción, o una sal, solvato, hidrato o éster farmacéuticamente aceptable del mismo. La formulación farmacéutica que comprende un oligómero antisentido puede comprender además un excipiente, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- Las sales farmacéuticamente aceptables son adecuadas para usar en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y están acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. (Ver, por ejemplo, el documento de S. M. Berge, y otros, *J. Pharmaceutical Sciences*, 66: 1-19 (1977). Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y la purificación final de los compuestos, o por separado al hacer reaccionar la función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Los ejemplos de sales de adición ácida no tóxicas farmacéuticamente aceptables son las sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico, o mediante el uso de otras metodologías documentadas tal como el intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y similares. Las sales metálicas alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares. Las sales aceptables farmacéuticamente incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario, cationes de amina formados mediante el uso de contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquil inferior y aril

sulfonato.

En algunos casos, las composiciones se formulan en cualquiera de las muchas formas de dosificación posibles tales como, pero sin limitarse a, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. En algunos casos, las composiciones se formulan como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión e incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede contener además estabilizadores. En los casos, una formulación o composición farmacéutica de la presente descripción incluye una solución, emulsión, microemulsión, espuma o formulación que contiene liposomas. (por ejemplo, liposomas catiónicos o no catiónicos).

La composición o formulación farmacéutica descrita en la presente descripción puede comprender uno o más potenciadores de la penetración, portadores, excipientes u otros ingredientes activos o inactivos según sea apropiado y bien conocido por los expertos en la técnica o descrito en la bibliografía publicada. En algunos casos, los liposomas también incluyen liposomas estéricamente estabilizados, por ejemplo, liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Estos lípidos especializados dan como resultado liposomas con una vida útil mejorada en circulación. En algunos casos, un liposoma estéricamente estabilizado comprende uno o más glicolípidos o está derivatizado con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). En algunos casos, se incluye un surfactante en la formulación o composiciones farmacéuticas. El uso de surfactantes en productos farmacéuticos, formulaciones y emulsiones es bien conocido en la técnica. En algunos casos, la presente descripción emplea un potenciador de la penetración para efectuar el suministro eficaz del oligonucleótido antisentido, por ejemplo, para ayudar a la difusión a través de las membranas celulares y/o mejorar la permeabilidad de un fármaco lipófilo. En algunos casos, los potenciadores de la penetración son un surfactante, un ácido graso, una sal biliar, un agente quelante o un no surfactante no quelante.

En algunos casos, la formulación farmacéutica comprende múltiples oligonucleótidos antisentido. En algunos casos, el oligonucleótido antisentido se administra en combinación con otro fármaco o agente terapéutico.

Terapias de combinación

En algunos casos, los ASO descritos en la presente descripción pueden usarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. En algunos casos, el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden comprender una molécula pequeña. Por ejemplo, el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden comprender una molécula pequeña descrita en los documentos WO2016128343A1, WO2017053982A1, WO2016196386A1, WO201428459A1, WO201524876A2, WO2013119916A2 y WO2014209841A2. En algunos casos, el uno o más agentes terapéuticos adicionales comprenden un ASO que puede usarse para corregir la retención de intrones. En algunos casos, el uno o más agentes adicionales se seleccionan de los ASO enumerados en la Tabla 1a o la Tabla 1b.

Tabla 1a. ASO ilustrativos para corregir la retención de intrones

SEQ ID NO:	Nombre	Secuencia (5'-3')	Intrón retenido
115	SCN1A-IVS21+6	CAGAGAAAUAUGUGUUCA	21
116	SCN1A-IVS21+11	AUAUUCAGAGAAAAUAGU	21
117	SCN1A-IVS21+16	AAAAAAUAUUCAGAGAAA	21
118	SCN1A-IVS21+21	AACAAUAAAAAUUUCAG	21
119	SCN1A-IVS21+26	UCCCAAACAAUAAAAUA	21
120	SCN1A-IVS21+31	UAUUUAUCCAAACAAUAA	21
121	SCN1A-IVS21+36	UUUGUUAUUAUUCCAAAC	21
122	SCN1A-IVS21+41	AUUAUUUUGUUAUUUAUC	21
123	SCN1A-IVS21+46	AUGUCAUUAUUUUGUUAU	21
124	SCN1A-IVS21+51	GAUGUAUGUCAUUAUUU	21
125	SCN1A-IVS21+56	UAAAAGAUGUAUGUCAUU	21
126	SCN1A-IVS21+61	CUAAAUAUAAGAUGUAUG	21
127	SCN1A-IVS21+66	AGGAACUAAAUAUAAGAU	21
128	SCN1A-IVS21+71	UUCUUAGGAACUAAAUA	21
129	SCN1A-IVS21+76	ACUUUUUCUUAGGAACUA	21
130	SCN1A-IVS21+81	UAUAUACUUUUUCUUAGG	21
131	SCN1A-IVS21-16	UGCAUGUUUUACUUUGGA	21
132	SCN1A-IVS21-21	GUUUUACUUUUGGAGUAAA	21
133	SCN1A-IVS21-26	ACUUUUGGAGUAAAUAUA	21
134	SCN1A-IVS21-31	GGAGAAAAAAUAUUUAG	21
135	SCN1A-IVS21-36	AAAAAAUAUUUAGACCUG	21
136	SCN1A-IVS21-41	UAUUUAGACCUGAUGUU	21
137	SCN1A-IVS21-46	UAGACCUGAUGUUUAUA	21
138	SCN1A-IVS21-51	CUGAUGUUUAUAUAUAU	21

139	SCN1A-IVS21-56	GUUUUAUAAAUAUUCUUA	21
140	SCN1A-IVS21-61	AUAAAUAUUCUACUGAU	21
141	SCN1A-IVS21-66	UAUUCUUACUGAUAAA	21
142	SCN1A-IVS21-71	UUACUGAUAAAUUUCA	21
143	SCN1A-IVS21-76	GAUAAAUAUUCAAAAGG	21
144	SCN1A-IVS21-81	AAUUUCAAAAGGGAAU	21
145	SCN1A-IVS21-27	CUUUGGAGUAAAAAUAAU	21
146	SCN1A-IVS21-28	UUUGGAGUAAAAAUAAU	21
148	SCN1A-IVS21-29	UUGGAGUAAAAAUAAU	21
149	SCN1A-IVS21-30	UGGAGUAAAAAUAAU	21
150	SCN1A-IVS21-32	GAGUAAAUAUAAUAGA	21
151	SCN1A-IVS21-33	AGUAAAUAUAAUAGAC	21
152	SCN1A-IVS21-34	GUAAAAUAUAAUAGACC	21
153	SCN1A-IVS21-35	AAAAAAUAUAAUAGACCU	21
154	SCN1A-IVS21-72	UACUGAUAAAUCCAA	21
155	SCN1A-IVS21-73	ACUGAUAAAUCAAA	21
156	SCN1A-IVS21-74	CUGAUAAAUCAAA	21
157	SCN1A-IVS21-75	UGAUAAAUCAAAAG	21
158	SCN1A-IVS21-77	AUAUAAAUCAAAAGGG	21
159	SCN1A-IVS21-78	UAUAAAUCAAAAGGG	21
160	SCN1A-IVS21-79	AUAUAAAUCAAAAGGG	21
161	SCN1A-IVS21-80	UAUAAAUCAAAAGGGAU	21
162		CAAGGAUAAAAGGUAGCA	21

Tabla 1b. - ASO ilustrativos para corregir la retención de intrones

SEQ ID NO:	Nombre	SeqTence (5'-3')	Intrón retenido
163	SCN1A-IVS21+6	CAGAGAAAATAGTGTCA	21
164	SCN1A-IVS21+11	ATATTCAAGAGAAAATAGT	21
165	SCN1A-IVS21+16	TAAAAATATTCAAGAGAAA	21
166	SCN1A-IVS21+21	ACAATAAAAATATTCAAG	21
167	SCN1A-IVS21+26	TTCCAACAAATAAAATA	21
168	SCN1A-IVS21+31	TATTATTCCAACAAATAA	21
169	SCN1A-IVS21+36	TTTGTATTATTCCAAC	21
170	SCN1A-IVS21+41	ATTATTTGTTATTATTC	21
171	SCN1A-IVS21+46	ATGTCATTATTTGTTAT	21
172	SCN1A-IVS21+51	GATGTATGTCATTATTT	21
173	SCN1A-IVS21+56	TAATAGATGTATGTCATT	21
174	SCN1A-IVS21+61	CTAAATAATAGATGTATG	21
175	SCN1A-IVS21+66	AGGAACAAATAATAGAT	21
176	SCN1A-IVS21+71	TTCTTAGGAACAAATAA	21
177	SCN1A-IVS21+76	ACIIIICTTAGGAACTA	21
178	SCN1A-IVS21+81	TATATACTTTCTTAGG	21
179	SCN1A-IVS21-16	TGCATGTTTACTTTGGA	21
180	SCN1A-IVS21-21	GTTTTACTTGGAGTAAA	21
181	SCN1A-IVS21-26	ACTTTGGAGTAAAATAA	21
182	SCN1A-IVS21-31	GGAGTAAAATAATTAG	21
183	SCN1A-IVS21-36	AAAAATAATTAGACCTG	21
184	SCN1A-IVS21-41	TAATTTAGACCTGATGTT	21
185	SCN1A-IVS21-46	TAGACCTGATGTTAATA	21
186	SCN1A-IVS21-51	CTGATGTTAATAAATAT	21
187	SCN1A-IVS21-56	GTTTAATAAATATTCTTA	21
188	SCN1A-IVS21-61	ATAAAATATTCTTACTGAT	21
189	SCN1A-IVS21-66	TATTCTTACTGATATAAT	21
190	SCN1A-IVS21-71	TTACTGATATAATTTC	21
191	SCN1A-IVS21-76	GATATAATTTCAAAAGG	21
192	SCN1A-IVS21-81	AATTTCAAAAGGGATA	21
193	SCN1A-IVS21-27	CTTTGGAGTAAAATAAT	21
194	SCN1A-IVS21-28	TTTGGAGTAAAATAATT	21
195	SCN1A-IVS21-29	TTGGAGTAAAATAATT	21
196	SCN1A-IVS21-30	TGGAGTAAAATAATT	21
197	SCN1A-IVS21-32	GAGTAAAATAATTAGA	21
198	SCN1A-IVS21-33	AGTAAAATAATTAGAC	21
199	SCN1A-IVS21-34	GTAAAATAATTAGACC	21

5	200	SCN1A-IVS21-35	TAAAAATAATTTAGACCT	21
	201	SCN1A-IVS21-72	TACTGATATAATTTCAA	21
	202	SCN1A-IVS21-73	ACTGATATAATTTCAAA	21
	203	SCN1A-IVS21-74	CTGATATAATTTCAAAA	21
	204	SCN1A-IVS21-75	TGATATAATTTCAAAAG	21
	205	SCN1A-IVS21-77	ATATAATTTCAAAAGGG	21
	206	SCN1A-IVS21-78	TATAATTTCAAAAGGGA	21
10	207	SCN1A-IVS21-79	ATAATTTCAAAAGGGAA	21
	208	SCN1A-IVS21-80	TAATTTCAAAAGGGAAAT	21
	209		CAAGGATTAAAGGTAGCA	21

Tratamiento de sujetos

- 15 Cualquiera de las composiciones proporcionadas en la presente descripción puede administrarse a un individuo. "Individuo" puede usarse indistintamente con "sujeto" o "paciente". Un individuo puede ser un mamífero, por ejemplo un ser humano o un animal tal como un primate no humano, un roedor, un conejo, una rata, un ratón, un caballo, un burro, una cabra, un gato, un perro, una vaca, un cerdo o una oveja. En algunos casos, el individuo es un ser humano. En algunos casos, el individuo es un feto, un embrión o un niño. En otros casos, el individuo puede ser otro organismo eucariota, tal como una planta. En algunos casos, las composiciones proporcionadas en la presente descripción se administran a una célula ex vivo.
- 20
- 25 En algunos casos, las composiciones proporcionadas en la presente descripción se administran a un individuo como un método para tratar una enfermedad o trastorno. En algunos casos, el individuo tiene una enfermedad genética, tal como cualquiera de las enfermedades descritas en la presente descripción. En algunos casos, el individuo está en riesgo de padecer una enfermedad, tal como cualquiera de las enfermedades descritas en la presente descripción. En algunos casos, el individuo tiene un mayor riesgo de tener una enfermedad o trastorno provocado por una cantidad insuficiente de una proteína o una actividad insuficiente de una proteína. Si un individuo tiene "un mayor riesgo" de tener una enfermedad o trastorno provocado por una cantidad insuficiente de una proteína o una actividad insuficiente de una proteína, el método implica un tratamiento preventivo o profiláctico. Por ejemplo, un individuo puede tener un mayor riesgo de padecer tal enfermedad o trastorno debido a antecedentes familiares de la enfermedad. Típicamente, los individuos con mayor riesgo de tener tal enfermedad o trastorno se benefician del tratamiento profiláctico (por ejemplo, al prevenir o retardar la aparición o progresión de la enfermedad o trastorno). En algunos casos, el feto se trata en el útero, por ejemplo, mediante la administración de la composición de ASO al feto directa o indirectamente (por ejemplo, a través de la madre).
- 30
- 35 Las rutas adecuadas para la administración de los ASO de la presente descripción pueden variar en dependencia del tipo de célula a la que se desea suministrar los ASO. El síndrome de Dravet afecta a múltiples tejidos y órganos; epilepsia generalizada con convulsiones febres plus tipo 2; convulsiones febres, familiares, 3A; migraña, hemipléjica familiar, 3; autismo; encefalopatía epiléptica infantil temprana, 13; síndrome del seno enfermo 1; enfermedad de Alzheimer o SUDEP, donde el cerebro es el tejido más significativamente afectado. Los ASO de la presente descripción pueden administrarse a pacientes por vía parenteral, por ejemplo, mediante inyección intratecal, inyección intracerebroventricular, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravítreo o inyección intravenosa.
- 40
- 45 En algunos casos, la enfermedad o afección es inducida por una mutación en $\text{Na}_v1.1$ (una proteína codificada por el gen *SCN1A*). En algunos casos, la mutación es una mutación de pérdida de función en $\text{Na}_v1.1$. En algunos casos, la mutación de pérdida de función en $\text{Na}_v1.1$ comprende una o más mutaciones que disminuyen o alteran la función de $\text{Na}_v1.1$ (por ejemplo, en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) con relación a la función de un $\text{Na}_v1.1$ de tipo silvestre. En algunos casos, la mutación de pérdida de función en $\text{Na}_v1.1$ comprende una o más mutaciones que dan como resultado un fenotipo de enfermedad. Las mutaciones de pérdida de función ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, R859C, T875M, V1353L, I1656M, R1657C, A1685V, M1841T y R1916G.
- 50
- 55 En otros casos, la mutación es una mutación de ganancia de función en $\text{Na}_v1.1$. En tales casos, la mutación de ganancia de función comprende una o más mutaciones que prolongan la activación de $\text{Na}_v1.1$ (por ejemplo, en 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) con relación a la función de un $\text{Na}_v1.1$ de tipo silvestre. 1. En tales casos, la mutación de ganancia de función en $\text{Na}_v1.1$ comprende una o más mutaciones que dan como resultado un fenotipo de enfermedad. Las mutaciones de ganancia de función ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, D188V, W1204R, R1648H y D1866Y.
- 60
- 65 En algunos casos, la enfermedad o afección es una encefalopatía. En algunos casos, la encefalopatía es inducida por una mutación de pérdida de función en $\text{Na}_v1.1$.
- En algunos casos, la encefalopatía es encefalopatía epiléptica. Las encefalopatías epilépticas ilustrativas incluyen, pero sin limitarse a, síndrome de Dravet (DS) (también conocido como epilepsia mioclónica grave de la infancia o SMEI); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI)-zona límite (SMEB); convulsión febril (FS); epilepsia

- generalizada con convulsiones febres plus (GEFS+); encefalopatía epileptica infantil temprana, 13; epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclínico-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; encefalopatía mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epileptica no clasificada; muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); encefalopatía SCN1A infantil temprana; encefalopatía epileptica infantil temprana (EIEE); o síndrome del seno enfermo 1. En algunos casos, la enfermedad o afección es encefalopatía epileptica, opcionalmente seleccionada del síndrome de Dravet (DS) (también conocido como epilepsia mioclónica grave de la infancia o SMEI); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI)-zona límite (SMEB); convulsión febril (FS); epilepsia generalizada con convulsiones febres plus (GEFS+); encefalopatía epileptica infantil temprana, 13; epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclínico-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; encefalopatía mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epileptica no clasificada; muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); y síndrome del seno enfermo 1.

En algunos casos, GEFS+ es epilepsia generalizada, con convulsiones febres plus, tipo 2.

En algunos casos, la convulsión febril es convulsiones febres, familiares, 3A.

En algunos casos, SMEB es SMEB sin punta-onda generalizada (SMEB-SW), SMEB sin convulsiones mioclónicas (SMEB-M), SMEB que carece de más de una característica de SMEI (SMEB-O) o epilepsia infantil intratable con convulsiones tónicas-clónicas generalizadas (ICEGTC).

En algunos casos, las enfermedades o afecciones inducidas por una mutación de pérdida de función en $\text{Na}_v1.1$ incluyen, pero sin limitarse a, síndrome de Dravet (DS) (también conocido como SMEI); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI)-zona límite (SMEB); convulsión febril (FS); epilepsia generalizada con convulsiones febres plus (GEFS+); encefalopatía epileptica infantil temprana, 13; epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclínico-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; encefalopatía mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epileptica no clasificada; muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); síndrome del seno enfermo 1; encefalopatía SCN1A infantil temprana; encefalopatía epileptica infantil temprana (EIEE); autismo; o convulsiones parciales migratorias malignas de la infancia.

En algunos casos, la enfermedad o afección es inducida por una mutación de ganancia de función en $\text{Na}_v1.1$. Las enfermedades o afecciones ilustrativas asociadas con una mutación de ganancia de función en $\text{Na}_v1.1$ incluyen, pero sin limitarse a, migraña. En algunos casos, la enfermedad o afección inducida por una mutación de ganancia de función en $\text{Na}_v1.1$ es migraña.

En algunos casos, la migraña es migraña, hemipléjica familiar, 3.

En algunos casos, la enfermedad o afección es epilepsia genética por $\text{Na}_v1.1$. La epilepsia genética por $\text{Na}_v1.1$ puede incluir una mutación de pérdida de función en $\text{Na}_v1.1$ o una mutación de ganancia de función en $\text{Na}_v1.1$. En algunos casos, la epilepsia genética por $\text{Na}_v1.1$ incluye una o más mutaciones hereditarias. En otros casos, la epilepsia genética por $\text{Na}_v1.1$ incluye una o más mutaciones de novo. En algunos casos, la epilepsia genética por $\text{Na}_v1.1$ incluye síndrome de Dravet (DS) (también conocido como epilepsia mioclónica grave de la infancia o SMEI); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI)-zona límite (SMEB); convulsión febril (FS); epilepsia generalizada con convulsiones febres plus (GEFS+); encefalopatía epileptica infantil temprana, 13; epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclínico-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; encefalopatía mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epileptica no clasificada; encefalopatía SCN1A infantil temprana; encefalopatía epileptica infantil temprana (EIEE); muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); o convulsiones parciales migratorias malignas de la infancia. En algunos casos, la epilepsia genética por $\text{Na}_v1.1$ asociada con una mutación de pérdida de función en $\text{Na}_v1.1$ incluye síndrome de Dravet (DS) (también conocido como epilepsia mioclónica grave de la infancia o SMEI); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI)-zona límite (SMEB); convulsión febril (FS); epilepsia generalizada con convulsiones febres plus (GEFS+); encefalopatía epileptica infantil temprana, 13; epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclínico-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; encefalopatía mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epileptica no clasificada; encefalopatía SCN1A infantil temprana; encefalopatía epileptica infantil temprana (EIEE); muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); convulsiones parciales migratorias malignas de la infancia.

En algunos casos, la enfermedad o afección se asocia con una haploinsuficiencia del gen SCN1A. Las enfermedades o afecciones ilustrativas asociadas con una haploinsuficiencia del gen SCN1A incluyen, pero sin limitarse a, síndrome de Dravet (DS) (también conocido como SMEI); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI)-zona límite (SMEB); convulsión febril (FS); epilepsia generalizada con convulsiones febres plus (GEFS+); encefalopatía epileptica infantil temprana, 13; epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclínico-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; encefalopatía mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epileptica no clasificada; encefalopatía SCN1A infantil temprana; encefalopatía epileptica infantil temprana (EIEE); muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); convulsiones parciales migratorias malignas de la infancia.

5 mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epiléptica no clasificada; muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); síndrome del seno enfermo 1; encefalopatía *SCN1A* infantil temprana; encefalopatía epiléptica infantil temprana (EIEE); o convulsiones parciales migratorias malignas de la infancia. En algunos casos, la enfermedad o afección es síndrome de Dravet (DS) (también conocido como SMEI); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI)-zona límite (SMEB); convulsión febril (FS); epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus (GEFS+); encefalopatía epiléptica infantil temprana, 13; epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclónico-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; encefalopatía mioclónica temprana; epilepsia mioclónica progresiva; hemiplejía alterna de la infancia; encefalopatía epiléptica no clasificada; muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); síndrome del seno enfermo 1; encefalopatía *SCN1A* infantil temprana; encefalopatía epiléptica infantil temprana (EIEE); o convulsiones parciales migratorias malignas de la infancia.

10 En algunos casos, la enfermedad o afección es síndrome de Dravet (DS).

15 20 25 El síndrome de Dravet (DS), conocido de cualquier otra manera como epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI), es una encefalopatía epiléptica que se presenta en el primer año de vida. El síndrome de Dravet es una encefalopatía epiléptica cada vez más reconocida en la que el diagnóstico clínico está soportado por el hallazgo de mutaciones en el gen del canal de sodio en aproximadamente el 70-80 % de los pacientes. Las mutaciones de los genes de los canales iónicos desempeñan un papel importante en la patogénesis de una variedad de síndromes de epilepsia, lo que hace que algunas epilepsias se consideren canalopatías. Los canales de sodio dependientes de voltaje (VGSC) desempeñan un papel esencial en la excitabilidad neuronal; por lo tanto, no sorprende que se hayan identificado muchas mutaciones asociadas con el síndrome de Down en el gen que codifica una subunidad VGSC. La enfermedad se describe, por ejemplo, en Mulley, y otros, 2005, y la descripción de la enfermedad en el documento OMIM #607208 (Online Mendelian Inheritance in Man, Johns Hopkins University, 1966-2015).

30 35 Entre el 70 % y el 80 % de los pacientes portan las anomalías del gen de la subunidad α1 del canal de sodio (*SCN1A*) y las mutaciones por truncamiento representan aproximadamente el 40 % y tienen una correlación significativa con una edad más temprana de aparición de las convulsiones. Las mutaciones de secuenciación se encuentran en aproximadamente el 70 % de los casos y comprenden mutaciones por truncamiento (40 %) y de pérdida de sentido (40 %), donde el resto son cambios en el sitio de corte y empalme. La mayoría de las mutaciones son de novo, pero las mutaciones familiares se producen en el 5-10 % de los casos y generalmente son de naturaleza de pérdida de sentido. Las mutaciones de *SCN1A* restantes comprenden mutaciones de sitio de corte y empalme y mutaciones de pérdida de sentido, la mayoría de las cuales caen en la región de formación de poros del canal de sodio. En la actualidad, se han asociado más de 500 mutaciones con el síndrome de Down y se distribuyen aleatoriamente a lo largo del gen (documento Mulley y otros, Neurol. 2006, 67, 1094-1095).

40 45 50 El gen *SCN1A* se localiza en el conglomerado de genes del canal de sodio en el cromosoma humano 2q24 y codifica las subunidades formadoras de poros α conocidas como Nav1.1 del canal de sodio dependiente de voltaje neuronal. El gen *SCN1A* abarca aproximadamente 100 kb de ADN genómico y comprende 26 exones. La proteína SCN1A consiste en cuatro dominios, cada uno con seis segmentos transmembrana. Se han identificado dos variantes de corte y empalme que dan como resultado una isoforma larga y corta que se diferencian por la presencia o ausencia de 11 aminoácidos en el lazo citoplasmático entre los dominios 1 y 2, en el exón 11 (documento Miller, y otros, 1993-2015, y Mulley, y otros, 2005, 25, 535-542, incorporado en la presente descripción como referencia).

55 60 Uno de los eventos de corte y empalme alternativos que puede conducir a transcritos de ARNm no productivos es la inclusión de un exón adicional en el transcripto de ARNm que puede inducir una descomposición del ARNm mediada por mutaciones sin sentido. La presente descripción proporciona composiciones y métodos para modular el corte y empalme alternativo de *SCN1A* para aumentar la producción de ARNm maduro que codifica proteínas y, por lo tanto, la proteína SCN1A funcional traducida. Estas composiciones y métodos incluyen oligómeros antisentido (ASO) que pueden provocar la omisión de exones y promover el corte y empalme constitutivo de preARNm de *SCN1A*. En diversos casos, la proteína SCN1A funcional puede aumentarse mediante el uso de los métodos de la descripción para tratar una afección provocada por la deficiencia de la proteína SCN1A.

65 70 75 En algunos casos, la enfermedad o afección es SMEB.
En algunos casos, la enfermedad o afección es GEFS+.
En algunos casos, la enfermedad o afección es una convulsión febril (por ejemplo, convulsiones febriles familiares, 3A).

En algunos casos, la enfermedad o afección es autismo (también conocido como trastorno del espectro autista o ASD).

5 En algunos casos, la enfermedad o afección es migraña (por ejemplo, migraña, hemipléjica familiar, 3).

En algunos casos, la enfermedad o afección es enfermedad de Alzheimer.

En algunos casos, la enfermedad o afección es encefalopatía por *SCN2A*.

10 En algunos casos, la enfermedad o afección es encefalopatía por *SCN8A*.

En algunos casos, la enfermedad o afección es arritmia por *SCN5A*.

15 En algunos casos, el oligonucleótido antisentido se administra con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido sujeto a través de la barrera hematoencefálica mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el suministro de agentes mediante la administración de un vector de adenovirus a neuronas motoras en tejido muscular se describe en la patente de Estados Unidos núm. 6,632,427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons", incorporado en la presente descripción como referencia. El suministro de vectores directamente al cerebro, por ejemplo, el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo o la sustancia negra, se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 6,756,523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain", incorporado en la presente descripción como referencia.

20 En algunos casos, los oligonucleótidos antisentido están unidos o conjugados con agentes que proporcionan propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas convenientes. En algunos casos, el oligonucleótido antisentido se acopla a una sustancia conocida en la técnica por promover la penetración o el transporte a través de la barrera hematoencefálica, por ejemplo, un anticuerpo contra el receptor de transferrina. En algunos casos, el oligonucleótido antisentido está unido a un vector viral, por ejemplo, para hacer que el compuesto antisentido sea más eficaz o aumentar el transporte a través de la barrera hematoencefálica. En algunos casos, la alteración osmótica de la barrera hematoencefálica se ve favorecida por la infusión de azúcares, por ejemplo, meso eritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, cellobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitol, L(-) arabitol, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos, por ejemplo, glutamina, lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Se describen métodos y materiales para mejorar la penetración por la barrera hematoencefálica por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 9,193,969, "Compositions and methods for selective delivery of oligonucleotide molecules to specific neuron types", la patente de Estados Unidos núm. 4,866,042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier", la patente de Estados Unidos núm. 6,294,520, "Material for passage through the blood-brain barrier" y la patente de Estados Unidos núm. 6,936,589, "Parenteral delivery systems", cada uno de ellos incorporado en la presente descripción como referencia.

45 En algunos casos, un ASO de la descripción se acopla a un inhibidor de la reabsorción de dopamina (DRI), un inhibidor selectivo de la reabsorción de serotonina (SSRI), un inhibidor de la reabsorción de noradrenalina (NRI), un inhibidor de la reabsorción de norepinefrina-dopamina (NDRI) y un inhibidor de la reabsorción de serotoninina-norepinefrina-dopamina (SNDRI), mediante el uso de los métodos descritos en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 9,193,969, incorporada en la presente descripción como referencia.

50 En los casos, los sujetos tratados mediante el uso de los métodos y composiciones se evalúan para determinar la mejora en su condición mediante el uso de cualquier método conocido y descrito en la técnica.

Métodos para identificar ASO adicionales que inducen la omisión de exones

55 También dentro del alcance de la presente descripción se encuentran los métodos para identificar o determinar los ASO que inducen la omisión de exones de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A*. Por ejemplo, un método puede comprender identificar o determinar los ASO que inducen la omisión de pseudoexones de un preARNm que contiene NIE de *SCN1A*. Los ASO que se hibridan específicamente con diferentes nucleótidos dentro de la región diana del preARNm pueden seleccionarse para identificar o determinar los ASO que mejoran la velocidad y/o el grado de corte y empalme del intrón diana. En algunos casos, el ASO puede bloquear o interferir con el(s) sitio(s) de unión de un represor/silenciador del corte y empalme. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para identificar (determinar) un ASO que cuando se hibrida con la región diana del exón da como resultado el efecto deseado (por ejemplo, omisión de pseudoexones, producción de proteínas o ARN funcional). Estos métodos también pueden usarse para identificar los ASO que inducen la omisión de exones incluidos mediante la unión a una región diana en un intrón que flanquea el exón incluido, o en un exón no incluido. Más abajo se proporciona un ejemplo de un método que puede usarse.

Puede realizarse una ronda de tamizaje, denominada "recorrido" con ASO, mediante el uso de ASO que se han diseñado para hibridarse con una región diana de un preARNm. Por ejemplo, los ASO usados en el recorrido con ASO pueden colocarse en mosaico cada 5 nucleótidos desde aproximadamente 100 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 3' del exón incluido (por ejemplo, una porción de la secuencia del exón localizada aguas arriba del exón diana/incluido) hasta aproximadamente 100 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 3' del exón diana/incluido y/o desde aproximadamente 100 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 5' del exón incluido a aproximadamente 100 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 5' del exón diana/incluido (por ejemplo, una porción de la secuencia del exón localizada aguas abajo del exón diana/incluido). Por ejemplo, puede diseñarse un primer ASO de 15 nucleótidos de longitud para hibridar específicamente con los nucleótidos +6 a +20 con relación al sitio de corte y empalme 3' del exón diana/incluido. Puede diseñarse un segundo ASO para hibridar específicamente con los nucleótidos +11 a +25 con relación al sitio de corte y empalme 3' del exón diana/incluido. Los ASO están diseñados como tales abarcando la región diana del preARNm. En algunos casos, los ASO pueden colocarse en mosaico más estrechamente, por ejemplo, cada 1, 2, 3 o 4 nucleótidos. Además, los ASO pueden colocarse en mosaico desde 100 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 5' hasta 100 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 3'. En algunos casos, los ASO pueden colocarse en mosaico de aproximadamente 1160 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 3' a aproximadamente 500 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 5'. En algunos casos, los ASO pueden colocarse en mosaico de aproximadamente 500 nucleótidos aguas arriba del sitio de corte y empalme 3' a aproximadamente 1920 nucleótidos aguas abajo del sitio de corte y empalme 3'.

Uno o más ASO, o un ASO de control (un ASO con una secuencia desordenada, secuencia que no se espera que se hibride con la región diana) se suministran, por ejemplo mediante transfección, en una línea celular relevante para la enfermedad que expresa el preARNm diana (por ejemplo, un preARNm que contiene NIE descrito en la presente descripción). Los efectos de omisión de exones de cada uno de los ASO pueden evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo mediante transcriptasa inversa (RT)-PCR mediante el uso de cebadores que abarcan la unión de corte y empalme, como se describe en el Ejemplo 4. Una reducción o ausencia de un producto de RT-PCR más largo producido mediante el uso de los cebadores que abarcan la región que contiene el exón incluido (por ejemplo, incluyendo los exones flanqueantes del NIE) en células tratadas con ASO en comparación con células tratadas con ASO de control indica que el corte y empalme del NIE diana se ha mejorado.

En algunos casos, la eficiencia de omisión de exones (o la eficiencia de corte y empalme para cortar y empalmar el intrón que contiene el NIE), la relación de preARNm cortado y empalmado con respecto a no cortado ni empalmado, la velocidad de corte y empalme o el grado de corte y empalme pueden mejorarse mediante el uso de los ASO descritos en la presente descripción. La cantidad de proteína o ARN funcional codificada por el preARNm diana también puede evaluarse para determinar si cada ASO logró el efecto deseado (por ejemplo, producción mejorada de proteína funcional). Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para evaluar y/o cuantificar la producción de proteínas, tal como transferencia Western, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia y ELISA.

Puede realizarse una segunda ronda de tamizaje, denominada "microrrecorrido" con ASO mediante el uso de los ASO que se han diseñado para hibridarse con una región diana de un preARNm. Los ASO usados en el microrrecorrido con ASO se colocan en mosaico cada 1 nucleótido para refinar aún más la secuencia de ácidos de nucleótidos del preARNm que, cuando se hibrida con un ASO, da como resultado la omisión de exones (o el corte y empalme mejorado de NIE).

Las regiones definidas por los ASO que promueven el corte y empalme del intrón diana se exploran con mayor detalle por medio de un "microrrecorrido" con ASO, que implica los ASO separados en etapas de 1 nt, así como también los ASO más largos, típicamente de 18-25 nt.

Como se describió anteriormente para el recorrido con ASO, el microrrecorrido con ASO se realiza suministrando uno o más ASO, o un ASO de control (un ASO con una secuencia desordenada, secuencia que no se espera que se hibride con la región diana), por ejemplo mediante transfección, en una línea celular relevante para la enfermedad que expresa el preARNm diana. Los efectos inductores de corte y empalme de cada uno de los ASO pueden evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo mediante transcriptasa inversa (RT)-PCR mediante el uso de cebadores que abarcan el NIE, como se describe en la presente descripción (ver, por ejemplo, el Ejemplo 4). Una reducción o ausencia de un producto de RT-PCR más largo producido mediante el uso de los cebadores que abarcan el NIE en células tratadas con ASO en comparación con las células tratadas con ASO de control indica que se ha mejorado la omisión de exones (o el corte y empalme del intrón diana que contiene un NIE). En algunos casos, la eficiencia de omisión de exones (o la eficiencia de corte y empalme para cortar y empalmar el intrón que contiene el NIE), la relación de preARNm cortado y empalmado con respecto a no cortado ni empalmado, la velocidad de corte y empalme o el grado de corte y empalme pueden mejorarse mediante el uso de los ASO descritos en la presente descripción. La cantidad de proteína o ARN funcional codificada por el preARNm diana también puede evaluarse para determinar si cada ASO logró el efecto deseado (por ejemplo, producción mejorada de proteína funcional). Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para evaluar y/o cuantificar la producción de proteínas, tal como transferencia Western, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia y ELISA.

Pueden probarse los ASO que, cuando se hibridan con una región de un preARNm, dan como resultado la omisión de exones (o el corte y empalme mejorado del intrón que contiene un NIE) y una mayor producción de proteínas *in vivo* mediante el uso de modelos animales, por ejemplo modelos de ratón transgénicos en los que se ha activado el gen humano de longitud completa o en modelos de enfermedad de ratón humanizados. Las rutas adecuadas para la administración de los ASO pueden variar en dependencia de la enfermedad y/o los tipos de células a los que se desea administrar los ASO. Los ASO pueden administrarse, por ejemplo, mediante inyección intratecal, inyección intracerebroventricular, inyección intraperitoneal, inyección intramuscular, inyección subcutánea, inyección intravítreas o inyección intravenosa. Después de la administración, las células, tejidos y/u órganos de los animales modelo pueden evaluarse para determinar el efecto del tratamiento con ASO, por ejemplo mediante la evaluación del empalme (eficiencia, velocidad, grado) y la producción de proteínas mediante métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente descripción. Los modelos animales también pueden ser cualquier indicación fenotípica o conductual de la enfermedad o la gravedad de la enfermedad.

Como se describe en la presente descripción en varios ejemplos, el exón 20x en el gen *SCN1A* humano es equivalente al exón 21x en el gen *SCN1A* de ratón.

También se encuentra dentro del alcance de la presente descripción un método para identificar o validar un exón inductor de NMD en presencia de un inhibidor de NMD, por ejemplo, cicloheximida. Un método ilustrativo se proporciona en la Figura 3 y el Ejemplo 2.

Ejemplos

La presente descripción se ilustrará más específicamente mediante los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1: Identificación de eventos de inclusión de exones inductores de NMD en transcriptos de *SCN1A* mediante RNAseq mediante el uso de secuenciación de nueva generación

La secuenciación completa del transcriptoma se llevó a cabo mediante secuenciación de nueva generación para revelar una instantánea de transcriptos producidos por el gen *SCN1A* para identificar eventos de inclusión de NIE. Para este propósito, se aisgó ARN poliA+ de fracciones nucleares y citoplasmáticas de HCN (neuronas corticales humanas) y se construyeron bibliotecas de ADNc mediante el uso del kit de preparación de bibliotecas de ARNm Illumina's TruSeq. Las bibliotecas se secuenciaron por pares, lo que dio como resultado lecturas de 100 nucleótidos que se mapearon para el genoma humano (febrero de 2009, ensamblaje GRCh37/hg19). Los resultados de la secuenciación para *SCN1A* se muestran en la Figura 2. Brevemente, la Figura 2 muestra las lecturas mapeadas visualizadas mediante el uso del navegador del genoma UCSC (operado por UCSC Genome Informatics Group (Center for Biomolecular Science & Engineering, Universidad de California, Santa Cruz, 1156 High Street, Santa Cruz, CA 95064) y descritas por, por ejemplo, en el documento de Rosenbloom, y otros, 2015, "The UCSC Genome Browser database: 2015 update", Nucleic Acids Research 43, Database Issue, doi: 10.1093/nar/gku1177) y la cobertura y el número de lecturas pueden inferirse a partir de las señales máximas. La altura de los picos indica el nivel de expresión dado por la densidad de las lecturas en una región particular. El panel superior muestra una representación gráfica del gen *SCN1A* a escala. El nivel de conservación entre 100 especies de vertebrados se muestra como picos. Los picos más altos corresponden a los exones (cuadros negros), mientras que no se observan picos para la mayoría de los intrones (líneas con puntas de flecha). Se identificaron picos de conservación en el intrón 20 (NM_006920), mostrados en el panel central. La inspección de las secuencias conservadas identificó una secuencia similar a exón de 64 pb (panel inferior, secuencia resaltada en gris) flanqueada por sitios de corte y empalme 3' y 5' (secuencia subrayada). La inclusión de este exón conduce a un desplazamiento de marco y a la introducción de un codón de terminación prematuro en el exón 21, lo que hace al transcripto una diana de NMD.

Las secuencias del gen *SCN1A*, preARNm, exones e intrones se resumen en la Tabla 2. La secuencia de cada exón o intrón se resume en la Tabla 3.

Tabla 2. Lista de secuencias del gen de *SCN1A* diana y de preARNm.

Species	SEQ ID NO.	Tipo de secuencia
Humana	SEQ ID NO. 1	gen de <i>SCN1A</i> (NC_000002.12)
	SEQ ID NO. 2	preARNm de <i>SCN1A</i> (que codifica, por ejemplo, el ARNm de <i>SCN1A</i> NM_006920.5)
	SEQ ID NO. 3	Gen del exón 20
	SEQ ID NO. 4	Gen del intrón 20
	SEQ ID NO. 5	Gen del exón 21
	SEQ ID NO. 6	Gen del exón 20x
	SEQ ID NO. 7	preARNm del exón 20
	SEQ ID NO. 8	preARNm del intrón 20
	SEQ ID NO. 9	preARNm del exón 21
	SEQ ID NO. 10	preARNm del exón 20x
Ratón	SEQ ID NO. 11	Gen de <i>SCN1A</i> (NC_000068.7)

SEQ ID NO. 12	preARNm de SCN1A (que codifica, por ejemplo, el ARNm de SCN1A NM_001313997.1)
SEQ ID NO. 13	Gen del exón 21
SEQ ID NO. 14	Gen del intrón 21
SEQ ID NO. 15	Gen del exón 22
SEQ ID NO. 16	Gen del exón 21x
SEQ ID NO. 17	preARNm del exón 21
SEQ ID NO. 18	preARNm del intrón 21
SEQ ID NO. 19	preARNm del exón 22
SEQ ID NO. 20	preARNm del exón 21x

Tabla 3. Secuencias de exón o intrón diana en transcritos de preARNm de SCN1A.

ES 2 965 696 T3

5	SEQ ID NO. 19	preARNm del exón 22	gauaaucuugcuccaacuuggaugggguggagcgugguuccccucagccuuauaua gg
10	SEQ ID NO. 20	preARNm del exón 21x	GUGGUUGUGAAUGCUCGUUJAGGAGCAAUUCCAUCAUCA GAAUGUGCUUCUGGUUUGCCUUUAUUCUGGCUAUUUUC GCAUCAUGGGCGUAAAUUUUGUUUGCUGGCAAAUUCUACCAC UGUGUUAACACCAACACUGGUGACAUUUUGAGAUCAGCGA AGUCAAUAUCAUUCUGAUJGCCUAAAACUAUAAGAAAGAA AUGAGACCGCCGGUGGAAAAAUGUGAAAGUAACUUUGAU AAUGUAGGAUUGGUACUUUCUUUGCUUCAAGUU

Ejemplo 2: Confirmación de NIE por medio de tratamiento con cicloheximida

El análisis de RT-PCR mediante el uso de ARN citoplasmático de células Neuro 2A de ratón (Figura 3A) y RenCell VM (células neuroprogenitoras humanas) (Figura 3B) tratadas con DMSO (CHX-) o tratadas con cicloheximida (CHX+) y cebadores en el exón 20 y el exón 23 confirmó la presencia de una banda correspondiente al exón inductor de NMD (20x). La identidad del producto se confirmó mediante secuenciación. Se realizó un análisis de densitometría de las bandas para calcular el por ciento de inclusión del exón 20x del transcripto de SCN1A total. El tratamiento de RenCell VM con cicloheximida (CHX+) para inhibir NMD condujo a un aumento de 2 veces del producto correspondiente al exón 20x inductor de NMD en la fracción citoplasmática (cf. barra gris claro, CHX-, a barra gris oscuro, CHX+).

Ejemplo 3: Recorrido de ASO de la región del exón 20x de SCN1A

Una representación gráfica del recorrido con ASO realizada para las secuencias de direccionamiento de la región del exón 20x de SCN1A inmediatamente aguas arriba del sitio de corte y empalme 3', a través del sitio de corte y empalme 3', el exón 20x, a través del sitio de corte y empalme 5' y aguas abajo del sitio de corte y empalme 5' mediante el uso de ASO 2'-MOE, cadena principal de PS, se muestra en la Figura 4. Los ASO se diseñaron para cubrir estas regiones desplazando 5 nucleótidos a la vez. Una lista de ASO que se dirigen a SCN1A se resume en la Tabla 4. Las secuencias de los ASO se resumen en la Tabla 5a y la Tabla 5b y en la Tabla 6a y la Tabla 6b.

Tabla 4. Lista de los ASO que se dirigen a SCN1A

Gen SEQ ID NO.	preARNm SEQ ID NO.	ASO SEQ ID NO.	NIE
SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2	SEQ ID NO: 21-67, 210-256	Exón 20x
SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12	SEQ ID NO: 68-114, 257-303	Exón 21x

Tabla 5a. Secuencias de los ASO que se dirigen a SCN1A humana

SEQ ID NO.	Nombre de la secuencia	secuencia de ASO
21	SCN1A-IVS19X-81	GATGCTCTCCGTCTGTTT
22	SCN1A-IVS19X-76	TTCATGATGCTCTCCGTC
23	SCN1A-IVS19X-71	TTTGTTTGTATGATGCTCT
24	SCN1A-IVS19X-66	TTACTTTTGTTCATGAT
25	SCN1A-IVS19X-61	TGGTGTACTTTTGTTC
26	SCN1A-IVS19X-56	ACATTGGTGTACTTTT
27	SCN1A-IVS19X-51	ACAGAACATTGGTGTAA
28	SCN1A-IVS19X-46	ATATGACAGAACATTGG
29	SCN1A-IVS19X-41	ATCTGATATGACAGAAC
30	SCN1A-IVS19X-36	TAGAAATCTGATATGACA
31	SCN1A-IVS19X-31	TTAGTTAGAAATCTGATA
32	SCN1A-IVS19X-26	TGTTATTAGTTAGAAATC
33	SCN1A-IVS19X-21	TAGTTTGTATTAGTTAG
34	SCN1A-IVS19X-16	ATATATAGTTGTTATTA
35	SCN1A-IVS19X-11	TAGAAATATATAGTTGT
36	SCN1A-IVS19X-6	CAAAATAGAAATATATAG
37	SCN1A-IVS19X-3	ATACAAAATAGAAATATA
38	SCN1A-IVS19X-1	CTATACAAAATAGAAATA
39	SCN1A-I19X/E20X+2	TCCTATACAAAATAGAAA
40	SCN1A-I19X/E20X+4	TATCCTATACAAAATAGA
41	SCN1A-I19X/E20X+6	ATTATCCTATACAAAATA
42	SCN1A-Ex20X+1	AGTTGGAGCAAGATTATC
43	SCN1A-Ex20X+6	ATCCAAGTTGGAGCAAGA
44	SCN1A-Ex20X+11	ACCCCATCCAAGTTGGAG
45	SCN1A-Ex20X+16	GCTCCACCCATCCAAGT
46	SCN1A-Ex20X+21	CCAGCGCTCCACCCATC
47	SCN1A-Ex20X-24	GAACCAGCGCTCCACCCC

ES 2 965 696 T3

48	SCN1A-Ex20X-19	GGGAGGAACCAGCGCTCC
49	SCN1A-Ex20X-3	ATAATAAAGGGCTCAGGG
50	SCN1A-Ex20X-1	CCATAATAAAGGGCTCAG
51	SCN1A-E20X/I20X-6	GTAATACAGTACCCATAA
52	SCN1A-E20X/I20X-4	GGGTAATACAGTACCCAT
53	SCN1A-IVS20X+13	TTAAAGGTAGCAAAAGGG
54	SCN1A-IVS20X+18	AAGGATTAAAGGTAGCAA
55	SCN1A-IVS20X+23	AGTGCAAGGATTAAAGGT
56	SCN1A-IVS20X+28	GTCACAGTGCAAGGATT
57	SCN1A-IVS20X+33	CATAAGTCACAGTGCAAG
58	SCN1A-IVS20X+38	CTACACATAAGTCACAGT
59	SCN1A-IVS20X+43	CCCCACTACACATAAGTC
60	SCN1A-IVS20X+48	CCTCACCCCCACTACACAT
61	SCN1A-IVS20X+53	CCCTCCCTCACCCCCACTA
62	SCN1A-IVS20X+58	CCAATCCCTCCCTCACCC
63	SCN1A-IVS20X+63	CCTTCCCAATCCCTCCCT
64	SCN1A-IVS20X+68	AGTACCCCTCCCAATCCC
65	SCN1A-IVS20X+73	ATAATAGTACCCCTTCCA
66	SCN1A-IVS20X+78	GTGCAATAATAGTACCCCT
67	SCN1A-IVS20X+83	CTGTGGTGCAATAATAGT

Tabla 5b. Secuencias de los ASO que se dirigen a *SCN1A* humana

SEQ ID NO.	Nombre de la secuencia	secuencia de ASO
210	SCN1A-IVS19X-81	GAUGCUCUCGUCUGUUU
211	SCN1A-IVS19X-76	UUCAUGAUGCUCUCGUC
212	SCN1A-IVS19X-71	UUUUGUUCAUGAUGCUCU
213	SCN1A-IVS19X-66	UUACUUUUUGUUCAUGAU
214	SCN1A-IVS19X-61	UGGUGUUACUUUUUGUUC
215	SCN1A-IVS19X-56	ACAUUUUGGUGUUACUUUU
216	SCN1A-IVS19X-51	ACAGAACAUUJGGUGUUA
217	SCN1A-IVS19X-46	AUAUGACAGAACAUUUGG
218	SCN1A-IVS19X-41	AUCUGAU AUGACAGAAC
219	SCN1A-IVS19X-36	UAGAAAUCUGAU AUGACA
220	SCN1A-IVS19X-31	UUAGUUAGAAAUCUGAU
221	SCN1A-IVS19X-26	UGUUUUAGUUAGAAAUC
222	SCN1A-IVS19X-21	UAGUUUGUUAUUAGUUAG
223	SCN1A-IVS19X-16	AUAUAUAGUUUGUUAUUA
224	SCN1A-IVS19X-11	UAGAAAUAUUAUAGUUUGU
225	SCN1A-IVS19X-6	CAAAAUAGAAAAUAUUAAG
226	SCN1A-IVS19X-3	AUACAAAAUAGAAAUAUA
227	SCN1A-IVS19X-1	CUAUACAAAUAUAGAAAUA
228	SCN1A-I19X/E20X+2	UCCUUAACAAAAUAGAAA
229	SCN1A-I19X/E20X+4	UAUCCUAUACAAAAUAGA
230	SCN1A-I19X/E20X+6	AUUAUCCUAUACAAAAUA
231	SCN1A-Ex20X+1	AGUUGGAGCAAGAUUAUC
232	SCN1A-Ex20X+6	AUCCAAGUUGGAGCAAGA
233	SCN1A-Ex20X+11	ACCCCAUCCAAGUUGGAG
234	SCN1A-Ex20X+16	GCUCCACCCCCAUCCAAGU
235	SCN1A-Ex20X+21	CCAGCGCUCCACCCAU
236	SCN1A-Ex20X-24	GAACCAGCGCUCCACCC
237	SCN1A-Ex20X-19	GGGAGGAACCAGCGCUCC
238	SCN1A-Ex20X-3	AUAUAUAAAGGGCUCAGGG
239	SCN1A-Ex20X-1	CCAUAUAUAAAGGGCUCAG
240	SCN1A-E20X/I20X-6	GUAAUACAGUACCAUAA
241	SCN1A-E20X/I20X-4	GGGUAAUACAGUACCCAU
242	SCN1A-IVS20X+13	UUAAAGGUAGCAAAGGG
243	SCN1A-IVS20X+18	AAGGAUAAAAGGUAGCAA
244	SCN1A-IVS20X+23	AGUGCAAGGAUAAAAGGU
245	SCN1A-IVS20X+28	GUCACAGUGCAAGGAUUA
246	SCN1A-IVS20X+33	CAUAAGUCACAGUGCAAG
247	SCN1A-IVS20X+38	CUACACAUAAAGUCACAGU
248	SCN1A-IVS20X+43	CCCCACUACACAUAAAGUC
249	SCN1A-IVS20X+48	CCUCACCCCCACUACACAU

250	SCN1A-IVS20X+53	CCCUCCCCUCACCCCCACUA
251	SCN1A-IVS20X+58	CCAAUCCCUCCCCUCACCC
252	SCN1A-IVS20X+63	CCUUCCCCAAUCCCUCCCCU
253	SCN1A-IVS20X+68	AGUACCCUUCCCAUCCCC
254	SCN1A-IVS20X+73	AUAUAUGUACCCUUCCCA
255	SCN1A-IVS20X+78	GUGCAAUAUAGUACCCU
256	SCN1A-IVS20X+83	CUGUGGUGCAAUAAUAGU

Tabla 6a. Secuencias de los ASO que se dirigen a SCN1A de ratón

SEQ ID NO.	Nombre de la secuencia	secuencia de ASO
68	mScn1a-IVS20X-81	GATGCTCACTGCCTGTTT
69	mScn1a-IVS20X-76	TATATGATGCTCACTGCC
70	mScn1a-IVS20X-71	TTTGTTATATGATGCTCA
71	mScn1a-IVS20X-66	TTACTTTTGTATATGAT
72	mScn1a-IVS20X-61	TGGTGTACTTTTGTAT
73	mScn1a-IVS20X-56	ACATTGGTGTACTTTT
74	mScn1a-IVS20X-51	ACAGAACATTGGTGTAA
75	mScn1a-IVS20X-46	ATATGACAGAACATTGG
76	mScn1a-IVS20X-41	AGCTGATATGACAGAAC
77	mScn1a-IVS20X-36	TAGAAAGCTGATATGACA
78	mScn1a-IVS20X-31	TTAGTTAGAAAGCTGATA
79	mScn1a-IVS20X-26	TATTATTAGTTAGAAAAGC
80	mScn1a-IVS20X-21	TAGTTTATTATTAGTTAG
81	mScn1a-IVS20X-16	ATATATAGTTTATTATTA
82	mScn1a-IVS20X-11	TAGAAATATATAGTTTAT
83	mScn1a-IVS20X-6	AAAAATAGAAATATATAG
84	mScn1a-IVS20X-3	ATATAAAATAGAAATATA
85	mScn1a-IVS20X-1	CTATATAAAATAGAAATA
86	mScn1a-I20X/E21X+2	TCCTATATAAAATAGAAA
87	mScn1a-I20X/E21X+4	TATCCTATATAAAATAGA
88	mScn1a-I20X/E21X+6	ATTATCCTATATAAAATA
89	mScn1a-Ex21X+1	AGTTGGAGCAAGATTATC
90	mScn1a-Ex21X+6	ATCCAAGTTGGAGCAAGA
91	mScn1a-Ex21X+11	ACCCCATCCAAGTTGGAG
92	mScn1a-Ex21X+16	GCTCCACCCCATCCAAGT
93	mScn1a-Ex21X+21	CCACCGCTCCACCCCATC
94	mScn1a-Ex21X-24	GAACCACCGCTCCACCCC
95	mScn1a-Ex21X-19	GGGAGGAACCACCGCTCC
96	mScn1a-Ex21X-3	ATAATAAAGGGCTGAGGG
97	mScn1a-Ex21X-1	CCATAATAAAGGGCTGAG
98	mScn1a-E21X/I21X-6	GTAATACAGTACAGTACCCATAA
99	mScn1a-E21X/I21X-4	GGGTAAATACAGTACCCAT
100	mScn1a-IVS21X+13	TTAAAGGTAGCAAAAGGG
101	mScn1a-IVS21X+18	AAGGATTAAGGTAGCAA
102	mScn1a-IVS21X+23	AGTGCAAGGATTAAGGT
103	mScn1a-IVS21X+28	GTCACAGTGCAAGGATTA
104	mScn1a-IVS21X+33	CATAAGTCACAGTGCAAG
105	mScn1a-IVS21X+38	CTACACATAAGTCACAGT
106	mScn1a-IVS21X+43	TCCCCACTACACATAAGTC
107	mScn1a-IVS21X+48	CTCAATCCCACTACACAT
108	mScn1a-IVS21X+53	CCTCCCTCAATCCCACTA
109	mScn1a-IVS21X+58	CACTCCCTCCCTCAATCC
110	mScn1a-IVS21X+63	CTTCCCACCTCCCTCCCTC
111	mScn1a-IVS21X+68	GTACCCCTCCCCACTCCCT
112	mScn1a-IVS21X+73	CAATTGTACCCCTCCAC
113	mScn1a-IVS21X+78	TGGTGCAATTGTACCCCTT
114	mScn1a-IVS21X+83	TACTGTGGTGCAATTGTA

Tabla 6b. Secuencias de los ASO que se dirigen a SCN1A de ratón

SEQ ID NO.	Nombre de la secuencia	secuencia de ASO
257	mScn1a-IVS20X-81	GAUGCUCACUGCCUGUUU
258	mScn1a-IVS20X-76	UUAUUGAUGCUCACUGCC
259	mScn1a-IVS20X-71	UUUUGUAUAUGAUGCUCA

	260	mScn1a-IVS20X-66	UUACUUUUUGUAUAUGAU
5	261	mScn1a-IVS20X-61	UGGUGUUACUUUUUGUAU
	262	mScn1a-IVS20X-56	ACAUUUGGUGUUACUUU
	263	mScn1a-IVS20X-51	ACAGAACAUUUGGUGUUA
	264	mScn1a-IVS20X-46	AUAUGACAGAACAUUUGG
	265	mScn1a-IVS20X-41	AGCUGAU AUGACAGAACAA
10	266	mScn1a-IVS20X-36	UAGAAAGCUGAU AUGACA
	267	mScn1a-IVS20X-31	UUAGUUAGAAAGCUGAU
	268	mScn1a-IVS20X-26	UAUUAUUAGUUAGAAAGC
	269	mScn1a-IVS20X-21	UAGUUUAAAUAUAGUUAG
	270	mScn1a-IVS20X-16	AUAUAUAGUUUAAAUAUUA
	271	mScn1a-IVS20X-11	UAGAAAAAAAUAUAGUUUAU
15	272	mScn1a-IVS20X-6	UAAAUAAGAAAUAUAG
	273	mScn1a-IVS20X-3	AUAUAAAAUAAGAAAUA
	274	mScn1a-IVS20X-1	CUAUUA AAAAUAAGAAAUA
	275	mScn1a-I20X/E21X+2	UCCUUAUAAAUAUAGAAA
	276	mScn1a-I20X/E21X+4	UAUCCUUAUAAAUAUAGA
20	277	mScn1a-I20X/E21X+6	AUUAUCCUUAUAAAUAUA
	278	mScn1a-Ex21X+1	AGUUGGAGCAAGAUUAUC
	279	mScn1a-Ex21X+6	AUCCAAGUUGGAGCAAGA
	280	mScn1a-Ex21X+11	ACCCCAUCCAAGUUGGAG
	281	mScn1a-Ex21X+16	GCUC CACCCAUCCAAGU
25	282	mScn1a-Ex21X+21	CCACCGCUCCACCCAU
	283	mScn1a-Ex21X-24	GAACCACCGCUCCACCC
	284	mScn1a-Ex21X-19	GGGAGGAACCACCGCUCC
	285	mScn1a-Ex21X-3	AUAAAUAAGGGCUGAGGG
	286	mScn1a-Ex21X-1	CCAUAUAAGGGCUGAG
30	287	mScn1a-E21X/I21X-6	GUAAUACAGUACCCAUAA
	288	mScn1a-E21X/I21X-4	GGGUAAAACAGUACCCAU
	289	mScn1a-IVS21X+13	UUAAAGGUAGCAAAGGG
	290	mScn1a-IVS21X+18	AAGGAUAAAAGGUAGCAA
	291	mScn1a-IVS21X+23	AGUGCAAGGAAUAAAAGGU
35	292	mScn1a-IVS21X+28	GUCACAGUGCAAGGAUUA
	293	mScn1a-IVS21X+33	CAUAAGUCACAGUGCAAG
	294	mScn1a-IVS21X+38	CUACACAUAAAGUCACAGU
	295	mScn1a-IVS21X+43	UCCCACUACACAUAAAGUC
	296	mScn1a-IVS21X+48	CUCAAUCCCACUACACAU
40	297	mScn1a-IVS21X+53	CCUCCCCUCAAUCCCACUA
	298	mScn1a-IVS21X+58	CACUCCCCUCCCUCAAUCC
	299	mScn1a-IVS21X+63	CUUCCCCACUCCCUCUCCUC
	300	mScn1a-IVS21X+68	GUACCCCUUCCCACUCCCU
	301	mScn1a-IVS21X+73	CAAUUGUACCCUUCCCCAC
45	302	mScn1a-IVS21X+78	UGGUGCAAUUGUACCCUU
	303	mScn1a-IVS21X+83	UACUGUGGUGCAAUUGUA

Ejemplo 4: Recorrido de ASO de la región del exón 20x de SCN1A evaluado mediante RT-PCR

50 Las secuencias de recorrido con ASO pueden evaluarse, por ejemplo, mediante RT-PCR. En la Figura 5A, un PAGE representativo muestra productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de SCN1A tratada de forma simulada (Falso), tratada con ASO de control de SMN (SMN) o tratada con un 2'-MOE ASO que se dirige a la región del exón 20x como se describe en la presente descripción en el Ejemplo 3 y en la descripción de la Figura 4, a una concentración de 20 μ M en células RenCell VM mediante absorción gímnotíca. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 20x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 20x, banda inferior) y el por ciento de inclusión del exón 20x se grafica en el gráfico de barras (Figura 5B). La línea negra indica que no hay cambios con respecto a Falso. Los productos de longitud completa también se normalizaron con respecto al control interno RPL32 y el cambio en veces con relación a Falso se grafica en el gráfico de barras (Figura 5C). La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a Falso.

55

60

Ejemplo 5: Recorrido de ASO de la región del exón 20x de SCN1A evaluada mediante RT-qPCR.

65 Los resultados de la amplificación de SCN1A por RT-qPCR con SYBR-verde normalizado con respecto a RPL32, obtenidos mediante el uso del mismo experimento de absorción de ASO que se evaluaron mediante RT-PCR con SYBR-safe como se muestra en la Figura 6, se grafican como cambio en veces con relación a Falso, lo que confirma los resultados de la RT-PCR con SYBR-safe. La línea negra indica una relación de 1 (sin cambios con respecto a

Falso).

Ejemplo 6: Efecto dependiente de la dosis de ASO seleccionado en células tratadas con CXH.

- 5 En la Figura 8A, un PAGE representativo muestra productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de Senia de ratón tratado de forma simulada (Falso, RNAiMAX solo) o tratado con Ex21x+1 2'-MOE ASO que se dirige al exón 21x (nomenclatura de ratón, corresponde al exón 20x humano), a concentraciones de 30 nM, 80 nM y 200 nM en células Neuro 2A (neuroblastoma de ratón) mediante transfección RNAiMAX. Ex21x+1 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1 (nomenclatura humana) son idénticos. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 21x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 21x, banda inferior) y el por ciento de inclusión del exón 21x se grafica en el gráfico de barras (Figura 8B). Los productos completos también se normalizaron con respecto al control interno HPRT y el cambio en relación con Falso se representa en el gráfico de barras (Figura 8C). La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a Falso.
- 10
- 15 Ejemplo 7: Inyección intravítrea (IVT) de ASO seleccionados.

La Figura 9A muestra los PAGE de productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de Senia de ratón del ojo izquierdo inyectado con PBS (1 µL) (-) o del ojo derecho inyectado con IVS20x-21, Ex21x+1, IVS21x+18, IVS21x+33 o Cep290 (ASO de control negativo; Gerard y otros, Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015) 2'-MOE ASO (1 µL) (+) a una concentración de 10 mM. Ex21x+1, IVS21x+18 e IVS21x+33 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1, IVS20x+18 e IVS20x+33 (nomenclatura humana) son idénticos. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 21x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 21x, banda inferior) y en la Figura 9B se grafica el por ciento de inclusión del exón 21x. Las barras blancas corresponden a ojos inyectados con ASO y las barras grises corresponden a ojos inyectados con PBS, n=5 en cada grupo. Los productos de longitud completa se normalizaron con respecto al control interno de GAPDH y en la Figura 9C se representa el cambio en veces del ojo inyectado con ASO con relación al ojo inyectado con PBS. La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a PBS, n=5 en cada grupo.

30 Ejemplo 8: Inyección intracerebroventricular (ICV) de ASO seleccionados.

35 La Figura 10A muestra los PAGE de productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de Senia de ratón de cerebros no inyectados (-, sin control de ASO) o inyectados con 300 µg de Cep290 (ASO de control negativo; Gerard y otros, Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015), Ex21x+1, IVS21x+18, IVS21x+33 2'-MOE ASO. Ex21x+1, IVS21x+18 e IVS21x+33 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1, IVS20x+18 e IVS20x+33 (nomenclatura humana) son idénticos. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 21x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 21x, banda inferior) y se graficó el por ciento de inclusión del exón 21x en el gráfico de barras en la Figura 10B, n=6 (cada ASO de direccionamiento), n = 5 (Cep290 ASO), n=1 (no inyectado, sin control de ASO). La PCR Taqman se realizó mediante el uso de dos sondas diferentes que abarcaban la unión de los exones 21 y 22 y los productos se normalizaron con respecto al control interno de GAPDH y el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los inyectados con Cep290 se graficó en el gráfico de barras en la Figura 10C. La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a Cep290, n=6 (cada ASO de direccionamiento), n=5 (Cep290 ASO), n=1 (no inyectado, sin control de ASO).

40 La Figura 11 representa una respuesta dependiente de la dosis ilustrativa de la inyección ICV de los ASO seleccionados en ratones C57BL6J (machos, 3 meses de edad). La Figura 11A muestra geles PAGE de productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de *Scn1a* de ratón de cerebros inyectados con 300 ug de Cep290 (ASO de control negativo; Gerard y otros, Mol. Ther. Nuc. Ac., 2015), o 33 ug, 100 ug y 300 ug de Ex21x+1 2'-MOE ASO. Ex21x+1 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1 (nomenclatura humana) son idénticos. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 21x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 21x, banda inferior). La Figura 11B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 21x a partir de los datos en la Figura 11A, n=5 (cada grupo). La Figura 11C representa un gráfico de los resultados de un ensayo de qPCR Taqman realizado mediante el uso de dos sondas diferentes que abarcan la unión de los exones 21 y 22. Los productos se normalizaron con respecto al control interno de *Gapdh* y se grafica el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los cerebros inyectados con Cep290. La línea negra indica una relación de 1 y ningún cambio con respecto a Cep290, n=5 (cada grupo).

45 La Figura 12 representa resultados ilustrativos de la inyección ICV de un ASO seleccionado en ratones C57BL6J (día 2 después del nacimiento). La Figura 12A muestra geles PAGE de productos de RT-PCR teñidos con SYBR-safe de *Scn1a* de ratón de cerebros no inyectados (-, sin control de ASO) o inyectados con 20 µg de Ex21x+1 2'-MOE ASO. Se cuantificaron dos productos correspondientes a la inclusión del exón 21x (banda superior) y longitud completa (exclusión del exón 21x, banda inferior). Ex21x+1 (nomenclatura de ratón) y Ex20x+1 (nomenclatura humana) son idénticos. La Figura 12B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 21x a partir de los datos en la Figura 12A, n=4 (cada grupo). La Figura 12C representa un gráfico de los resultados de un ensayo de qPCR Taqman realizado mediante el uso de dos sondas diferentes que abarcan la unión de los exones 21 y 22. Los productos se normalizaron con respecto al control interno de *Gapdh* y se grafica el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los cerebros sin control de ASO. La línea negra indica una relación

de 1 y ningún cambio con respecto al control sin ASO, n=4 (cada grupo).

Ejemplo 9: Aumento dirigido de la producción de genes nucleares para el tratamiento del síndrome de Dravet

- 5 El síndrome de Dravet (DS) es una enfermedad genética infantil devastadora caracterizada por convulsiones graves, deterioro cognitivo y motor y la muerte. La causa principal de DS es la disminución de la expresión de la subunidad alfa tipo 1 del canal dependiente de voltaje de sodio (Nav1.1). El evento de corte y empalme no productivo de *SCN1A* se conserva entre el ser humano y el ratón. La Figura 13A representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 21x en las muestras de CNS de ratón indicadas. La Figura 13B representa un gráfico que grafica el por ciento de inclusión del exón 20x en las muestras de CNS humano indicadas. En este estudio, se utilizó una terapia con oligonucleótidos antisentido (ASO) para aumentar el ARNm de *Scn1a* productivo y, en consecuencia, restaurar los niveles de la proteína Nav1.1.
- 10 La Figura 14A representa un gráfico que grafica la disminución porcentual en la inclusión del exón 21x en las dosis indicadas (n = 3-6 por grupo). La Figura 14B representa un gráfico que grafica el aumento porcentual en ARNm de *Scn1a* en las dosis indicadas (n = 3-6 por grupo). La Figura 14C representa un gráfico que grafica el aumento porcentual en los niveles de proteína Nav1.1 en las dosis indicadas (n = 2 por grupo).
- 15 La Figura 15A representa un gráfico que grafica la disminución porcentual en la inclusión del exón 21x en las dosis indicadas (n = 4 por grupo). La Figura 15B representa un gráfico que representa el aumento porcentual en ARNm de *Scn1a* en las dosis indicadas (n = 4 por grupo).
- 20 La Figura 16 representa un ASO de direccionamiento a *Scn1a* seleccionado administrado en una dosis de 10 ug mediante inyección ICV en ratones del día 2 después del nacimiento evaluados el día 5 después de la inyección mediante Taqman qPCR de *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A*, *SCN4A*, *SCN5A*, *SCN7A*, *SCN8A*, *SCN9A*, *SCN10A* y *SCN11A* para evaluar la selectividad por la diana. Los resultados de amplificación por Taqman-qPCR normalizados con respecto a *Gapdh*, obtenidos mediante el uso de Ex20x+1 ASO, se grafican como cambio en veces con relación a los ratones inyectados con PBS (n = 3-6 por grupo).
- 25 La Figura 17 representa resultados ilustrativos de la inyección intracerebroventricular (ICV) en el día 2 después del nacimiento de un ASO seleccionado a la dosis indicada en ratones Dravet F1 de tipo silvestre (WT) o heterocigotos (HET) de los cruces 129S-*Scn1a*^{tm1Kea} x C57BL/6J a los 3 días después de la inyección (n = 9-14 por grupo). La Figura 17A representa un gráfico de los resultados de un ensayo Taqman qPCR realizado mediante el uso de una sonda que abarca los exones 21 y 22. Los productos se normalizaron con respecto al control interno de *Gapdh* y se grafica el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los cerebros inyectados con PBS. La Figura 17B representa un gráfico de los resultados de una transferencia Western realizada mediante el uso de un anticuerpo anti-Nav1.1. Los productos se normalizaron con respecto a bandas teñidas con Ponceau y se grafica el cambio en veces de los cerebros inyectados con ASO con relación a los cerebros inyectados con PBS.
- 30 La Figura 18 es un gráfico que grafica el aumento en el nivel de ARNm de *Scn1a* en cortes coronales de cerebro de ratones durante el tiempo posterior a la inyección ICV de un ASO de direccionamiento a *SCN1A*. Como se muestra, el aumento en el nivel de ARNm de *Scn1a*, cuantificado mediante Taqman qPCR, se mantuvo durante al menos 80 días después de la inyección (n = 3-9 por grupo).
- 35 La Figura 19 es un gráfico que grafica el aumento en el nivel de ARNm de *Scn1a* en cortes coronales de cerebro de ratones durante el tiempo posterior a la inyección ICV de un ASO de direccionamiento a *SCN1A*. Como se muestra, el aumento en el nivel de ARNm de *Scn1a*, cuantificado mediante Taqman qPCR, se mantuvo durante al menos 80 días después de la inyección (n = 3-9 por grupo).
- 40 La Figura 20 es una curva de supervivencia ilustrativa que demuestra un beneficio de supervivencia del 100 % proporcionado por un ASO de direccionamiento a *SCN1A* en el modelo de ratón Dravet. Los ratones Dravet WT y heterocigotos (+/-), descendientes F1 de los cruces 129S-*scn1*^{tm1Kea} x C57BL/6J, recibieron una inyección ICV de dosis única de 20 µg de PBS o ASO a ciegas (tratamiento marcado como A o B) en el día 2 después del nacimiento, y se monitoreó su supervivencia. Como se muestra, los ratones del grupo A +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con PBS) comenzaron a morir aproximadamente a partir del día 16 después del nacimiento, mientras que todos los ratones de los otros tres grupos, incluido el grupo B +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con ASO), sobrevivieron al menos 35 días después del nacimiento (n = 32-39 por grupo).
- 45 La Figura 21 es un gráfico que grafica el efecto de la inyección ICV de un ASO de direccionamiento a *SCN1A* en ratones Dravet. Los ratones Dravet WT y heterocigotos (+/-), descendientes F1 de los cruces 129S-*scn1*^{tm1Kea} x C57BL/6J, recibieron una inyección ICV de dosis única de 20 µg de PBS o ASO a ciegas (tratamiento marcado como A o B) en el día 2 después del nacimiento, y se monitoreó su supervivencia. Como se muestra, los ratones del grupo A +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con PBS) comenzaron a morir aproximadamente a partir del día 16 después del nacimiento, mientras que todos los ratones de los otros tres grupos, incluido el grupo B +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con ASO), sobrevivieron al menos 35 días después del nacimiento (n = 32-39 por grupo).
- 50 La Figura 22 es un gráfico que grafica el efecto de la inyección ICV de un ASO de direccionamiento a *SCN1A* en ratones Dravet. Los ratones Dravet WT y heterocigotos (+/-), descendientes F1 de los cruces 129S-*scn1*^{tm1Kea} x C57BL/6J, recibieron una inyección ICV de dosis única de 20 µg de PBS o ASO a ciegas (tratamiento marcado como A o B) en el día 2 después del nacimiento, y se monitoreó su supervivencia. Como se muestra, los ratones del grupo A +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con PBS) comenzaron a morir aproximadamente a partir del día 16 después del nacimiento, mientras que todos los ratones de los otros tres grupos, incluido el grupo B +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con ASO), sobrevivieron al menos 35 días después del nacimiento (n = 32-39 por grupo).
- 55 La Figura 23 es un gráfico que grafica el efecto de la inyección ICV de un ASO de direccionamiento a *SCN1A* en ratones Dravet. Los ratones Dravet WT y heterocigotos (+/-), descendientes F1 de los cruces 129S-*scn1*^{tm1Kea} x C57BL/6J, recibieron una inyección ICV de dosis única de 20 µg de PBS o ASO a ciegas (tratamiento marcado como A o B) en el día 2 después del nacimiento, y se monitoreó su supervivencia. Como se muestra, los ratones del grupo A +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con PBS) comenzaron a morir aproximadamente a partir del día 16 después del nacimiento, mientras que todos los ratones de los otros tres grupos, incluido el grupo B +/- (ratones Dravet que recibieron tratamiento con ASO), sobrevivieron al menos 35 días después del nacimiento (n = 32-39 por grupo).
- 60 Las secuencias de los ASO se resumen en la Tabla 7a y la Tabla 7b.

Tabla 7a. Secuencias de los ASO que se dirigen a *SCN1A* humana

ID de ASO	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO:
1	TTGGAGCAAGATTATC	304
2	GTTGGAGCAAGATTATC	305
3	GTTGGAGCAAGATTAT	306

ES 2 965 696 T3

4	AGTTGGAGCAAGATTAT	307
5	AGTTGGAGCAAGATTA	308
6	GATTATCCTATACAAAAT	309
7	AGATTATCCTATACAAAA	310
8	AAGATTATCCTATACAAA	311
9	CAAGATTATCCTATACAA	312
10	GCAAGATTATCCTATACA	313
11	AGCAAGATTATCCTATAC	314
12	GAGCAAGATTATCCTATA	315
13	GGAGCAAGATTATCCTAT	316
14	TGGAGCAAGATTATCCTA	317
15	GTTGGAGCAAGATTATCC	318
16	TTGGAGCAAGATTATCCT	319
18	AAGTTGGAGCAAGATTAT	320
19	CAAGTTGGAGCAAGATTA	321
20	CCAAGTTGGAGCAAGATT	322
21	TCCAAGTTGGAGCAAGAT	323
22	AGTACCCATAATAAAGGG	324
23	AATACAGTACCCATAATA	325
24	ATTAAGGTAGCAAAAGG	326
25	GATTAAGGTAGCAAAAG	327
26	GGATTAAGGTAGCAAAA	328
27	AGGATTAAGGTAGCAAA	329
29	CAAGGATTAAGGTAGCA	330
30	GCAAGGATTAAGGTAGC	331
31	TGCAAGGATTAAGGTAG	332
32	GTGCAAGGATTAAGGTA	333
33	AGTCACAGTGCAAGGATT	334
34	AAGTCACAGTGCAAGGAT	335
35	TAAGTCACAGTGCAAGGA	336
36	ATAAGTCACAGTGCAAGG	337
38	ACATAAGTCACAGTGCAA	338
39	CACATAAGTCACAGTGCA	339
40	ACACATAAGTCACAGTGC	340
41	TACACATAAGTCACAGTG	341

Tabla 7b. Secuencias de los ASO que se dirigen a SCN1A humana

ID de ASO	Secuencia 5'-3'	SEQ ID NO:
1_U	UUGGAGCAAGAUUAUC	342
2_U	GUUGGAGCAAGAUUAUC	343
3_U	GUUGGAGCAAGAUUAU	344
4_U	AGUUGGAGCAAGAUUAU	345
5_U	AGUUGGAGCAAGAUUA	346
6_U	GAUUAUCCUAUACAAAAU	347
7_U	AGAUUAUCCUAUACAAAA	348
8_U	AAGAUUAUCCUAUACAAA	349
9_U	CAAGAUUAUCCUAUACAA	350
10_U	GCAAGAUUAUCCUAUACA	351
11_U	AGCAAGAUUAUCCUAUAC	352
12_U	GAGCAAGAUUAUCCUAUA	353
13_U	GGAGCAAGAUUAUCCUAU	354
14_U	UGGAGCAAGAUUAUCCUA	355
15_U	GUUGGAGCAAGAUUAUCC	356
16_U	UUGGAGCAAGAUUAUCCU	357
18_U	AAGUUGGAGCAAGAUUAU	358
19_U	CAAGUUGGAGCAAGAUUA	359
20_U	CCAAGUUGGAGCAAGAUU	360
21_U	UCCAAGUUGGAGCAAGAU	361
22_U	AGUACCCAUAAAAGGG	362
23_U	AAUACAGUACCCAUAAAUA	363
24_U	AUUAAAGGUAGCAAAAGG	364
25_U	GAUAAAAGGUAGCAAAAG	365
26_U	GGAUAAAAGGUAGCAAAA	366

5

10

15

Aunque los casos preferidos de la presente descripción se demostraron y describieron en la presente descripción, será obvio para los expertos en la técnica que tales casos se proporcionan sólo a manera de ejemplo. Debe entenderse que diversas alternativas a los casos descritos en la presente descripción pueden emplearse en la práctica de la presente descripción. Se pretende definir el alcance de la invención con las siguientes reivindicaciones.

27_U	AGGAUUAAAAGGUAGCAAA	367
29_U	CAAGGAUUAAGGUAGCA	368
30_U	GCAAGGAUUAAGGUAGC	369
31_U	UGCAAGGAUUAAGGUAG	370
32_U	GUGCAAGGAUUAAGGUA	371
33_U	AGUCACAGUGCAAGGAU	372
34_U	AAGUCACAGUGCAAGGAU	373
35_U	UAAGUCACAGUGCAAGGA	374
36_U	AUAAGUCACAGUGCAAGG	375
38_U	ACAUAAAGUCACAGUGCAA	376
39_U	CACAUAAAGUCACAGUGCA	377
40_U	ACACAUAAAGUCACAGUGC	378
41_U	UACACAUAAAGUCACAGUG	379

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para usar como un medicamento que comprende:
 - 5 un oligómero antisentido, y
un excipiente farmacéuticamente aceptable;
en donde el oligómero antisentido se une a una porción diana de un preARNm que contiene un exón inductor de la descomposición de ARN mediada por mutaciones sin sentido (exón NMD) y que codifica la proteína Nav1.1, de manera que el oligómero antisentido promueve la exclusión del exón NMD del preARNm que contiene el exón NMD y codifica Nav1.1, lo que aumenta de esta manera el nivel de ARNm procesado que codifica la proteína Nav1.1, y lo que aumenta la expresión de la proteína Nav1.1 en una célula que tiene el preARNm, cuando la célula se trata con el oligómero antisentido, en comparación con una célula de control correspondiente no tratada con el oligómero antisentido,
en donde el exón NMD se localiza en una región de GRCh37/hg19: chr2:166,863,740 a GRCh37/hg19:
chr2:166,863,803.
 - 10 2. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1 en el tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, en donde la enfermedad o afección está asociada con una cantidad o actividad deficiente de la proteína Nav1.1 codificada por el gen *SCN1A* en el sujeto.
 - 15 3. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad o afección está asociada con haploinsuficiencia del gen *SCN1A*.
 - 20 4. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 2 o 3, en donde la enfermedad o afección es el síndrome de Dravet (DS); epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI) límite (SMEB; también conocida como SMEI límite); convulsión febril (FS); epilepsia generalizada con convulsiones febres plus (GEFS+); epilepsia generalizada criptogénica; epilepsia focal criptogénica; epilepsia mioclónica-astática; síndrome de Lennox-Gastaut; síndrome de West; espasmos idiopáticos; muerte súbita inesperada en epilepsia (SUDEP); autismo; convulsiones parciales migratorias malignas de la infancia; o enfermedad de Alzheimer.
 - 25 5. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde la enfermedad o afección está asociada con una mutación del gen de *SCN1A* que codifica la proteína Nav1.1.
 - 30 6. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la porción diana:
 - 35 (i) se encuentra dentro de una secuencia de intrones que flanquea el exón NMD;
(ii) se solapa al menos parcialmente con el exón NMD; o
(iii) se encuentra dentro del exón NMD.
 - 40 7. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la porción diana comprende una secuencia con al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia con una región que comprende al menos 8 ácidos nucleicos contiguos de las SEQ ID NO: 10, 7, 8 o 9.
 - 45 8. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia que es al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o 100 % complementaria a la porción diana.
 - 50 9. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO: , 21-61, 64-67, 210-250, 253-256 y 304-379.
 - 55 10. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el oligómero antisentido es una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21-61, 64-67, 210-250, 253-256 y 304-379.
 - 60 11. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde el oligómero antisentido consiste en de 12 a 50 nucleobases, o de 12 a 20 nucleobases.
 - 65 12. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el oligómero antisentido comprende una modificación de la cadena principal, un resto de azúcar modificado o una de sus combinaciones.
 13. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde cada nucleótido del oligómero antisentido comprende un resto 2'-O-metoxietilo.

14. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la composición farmacéutica se formula para inyección intratecal o inyección intracerebroventricular.
- 5 15. Una composición farmacéutica para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el oligómero antisentido se conjuga con un resto que comprende un nucleótido abásico, un políéter, una poliamina, una poliamida, un péptido, un carbohidrato, un lípido, un compuesto de polihidrocarburo, o un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo contra el receptor de transferrina.
- 10 16. Una composición farmacéutica que comprende un vector viral que codifica un oligómero antisentido, en donde el oligómero antisentido se une a una porción diana de un preARNm que contiene un exón inductor de la descomposición de ARN mediada por mutaciones sin sentido (exón NMD) y que codifica la proteína Nav1.1, de manera que el oligómero antisentido promueve la exclusión del exón NMD del preARNm que contiene el exón NMD y codifica Nav1.1, lo que aumenta de esta manera un nivel de ARNm procesado que codifica la proteína Nav1.1 y aumenta la expresión de la proteína Nav1.1 en una célula que tiene el preARNm, cuando el vector viral se introduce en la célula, en comparación con una célula de control correspondiente que no se trata con el vector viral, en donde el exón NMD se localiza en una región de GRCh37/hg19: chr2:166,863,740 a GRCh37/hg19: chr2:166,863,803.
- 20 17. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 21-61, 64-67, 210-250, 253-256 y 304-379.
- 25 18. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16 o 17 para usar como un medicamento.
- 30 19. Un oligómero antisentido que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 32-35, 39, 40, 42-45, 49-51, 54-59, 66, 221-224, 228, 229, 231-234, 238-240, 243-248, 255, 304-308, 312-316, 318-324, 326-335, 337-346, 350-354, 356-362, 364-373 y 375-379.
- 35 20. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el oligómero antisentido es la SEQ ID NO: 42 o 231.
- 40 21. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el oligómero antisentido es la SEQ ID NO: 54 o 243.
- 45 22. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el oligómero antisentido es la SEQ ID NO: 306 o 344.
- 50 23. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el oligómero antisentido es la SEQ ID NO: 307 o 345.
- 55 24. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el oligómero antisentido es la SEQ ID NO: 308 o 346.
- 60 25. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el oligómero antisentido es la SEQ ID NO: 330 o 368.
- 65 26. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 19-25, en donde el oligómero antisentido comprende una modificación de la cadena principal, un resto de azúcar modificado o una de sus combinaciones.
- 70 27. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 19-26, en donde el oligómero antisentido comprende un enlace fosforotioato.
- 75 28. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 19-26, en donde el oligómero antisentido comprende un enlace fosforodiamidato.
- 80 29. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 19-28, en donde el oligómero antisentido comprende al menos un resto de azúcar modificado.
- 85 30. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 19-29, en donde el oligómero antisentido comprende un resto 2'-O-metilo, un resto 2'-fluoro o un resto 2'-O-metoxietilo.
- 90 31. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 19-30, en donde al menos un nucleótido del oligómero antisentido comprende un resto 2'-O-metoxietilo.
- 95 32. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 19-31, en donde cada nucleótido del oligómero antisentido comprende un resto 2'-O-metoxietilo.

33. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 19-32, en donde el oligómero antisentido se conjuga con un resto que comprende un nucleótido abásico, un poliéster, una poliamina, una poliamida, un péptido, un carbohidrato, un lípido, un compuesto de polihidrocarburo, o un anticuerpo, opcionalmente un anticuerpo contra el receptor de transferrina.

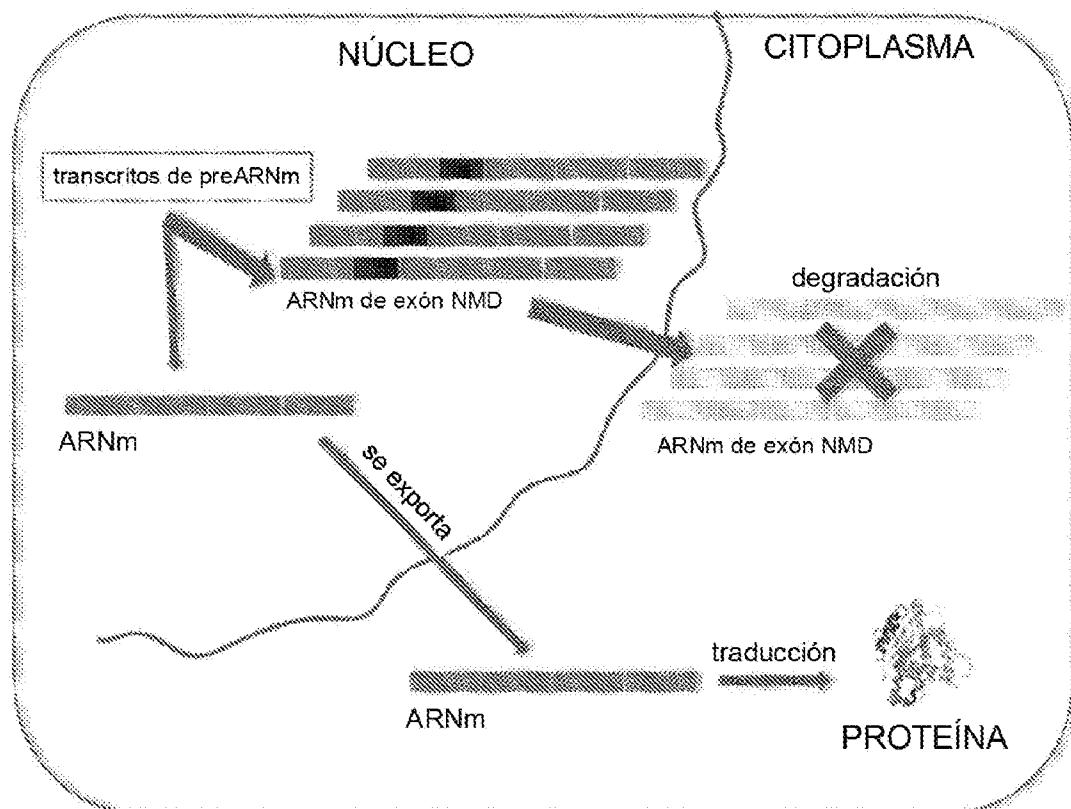


FIGURA 1A

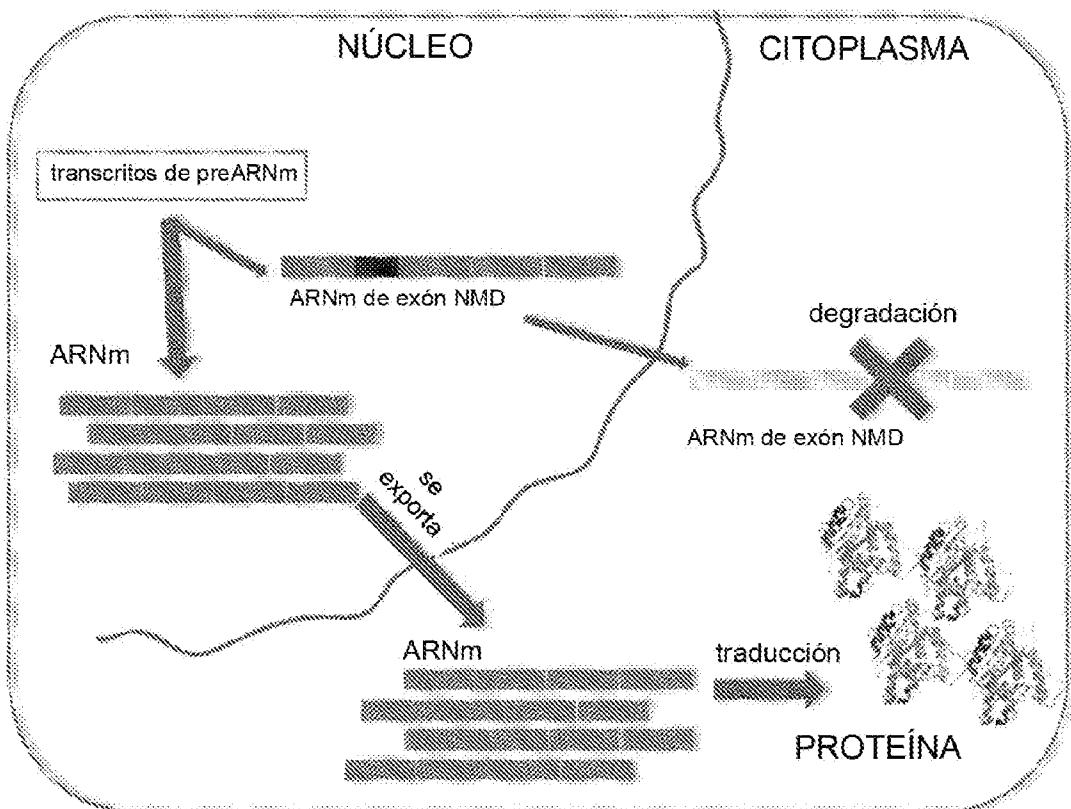


FIGURA 1B

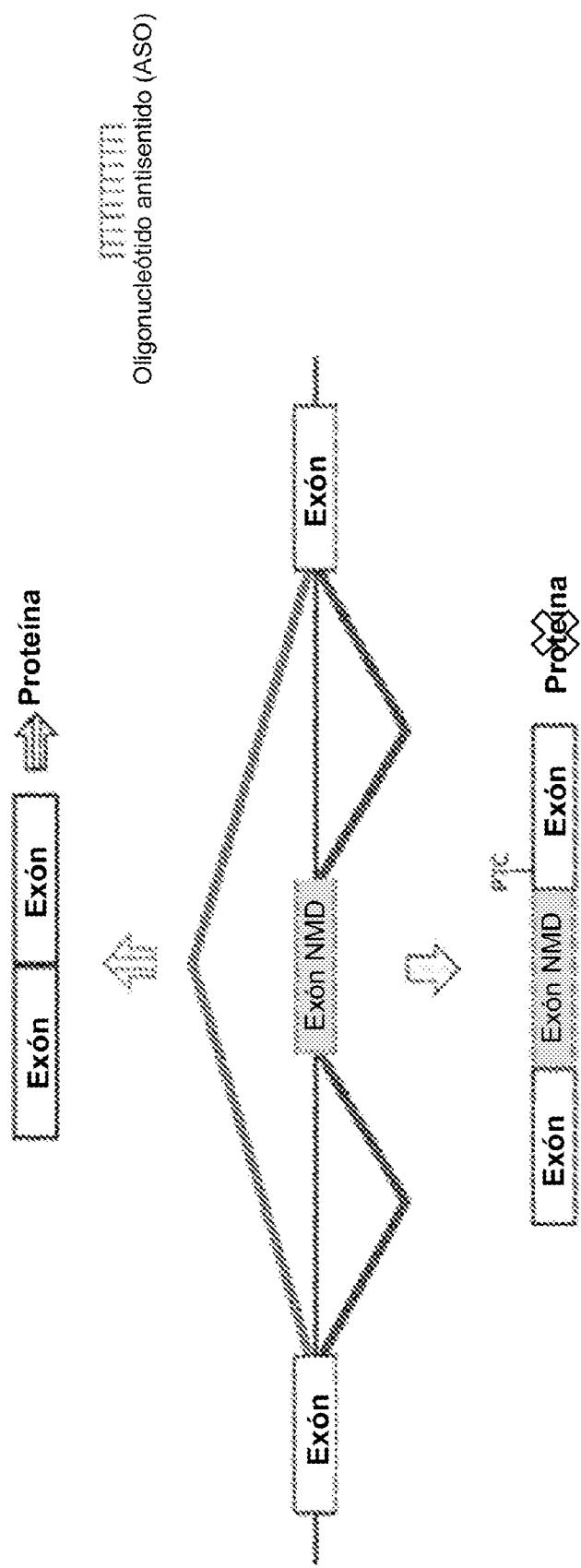


FIGURA 1C

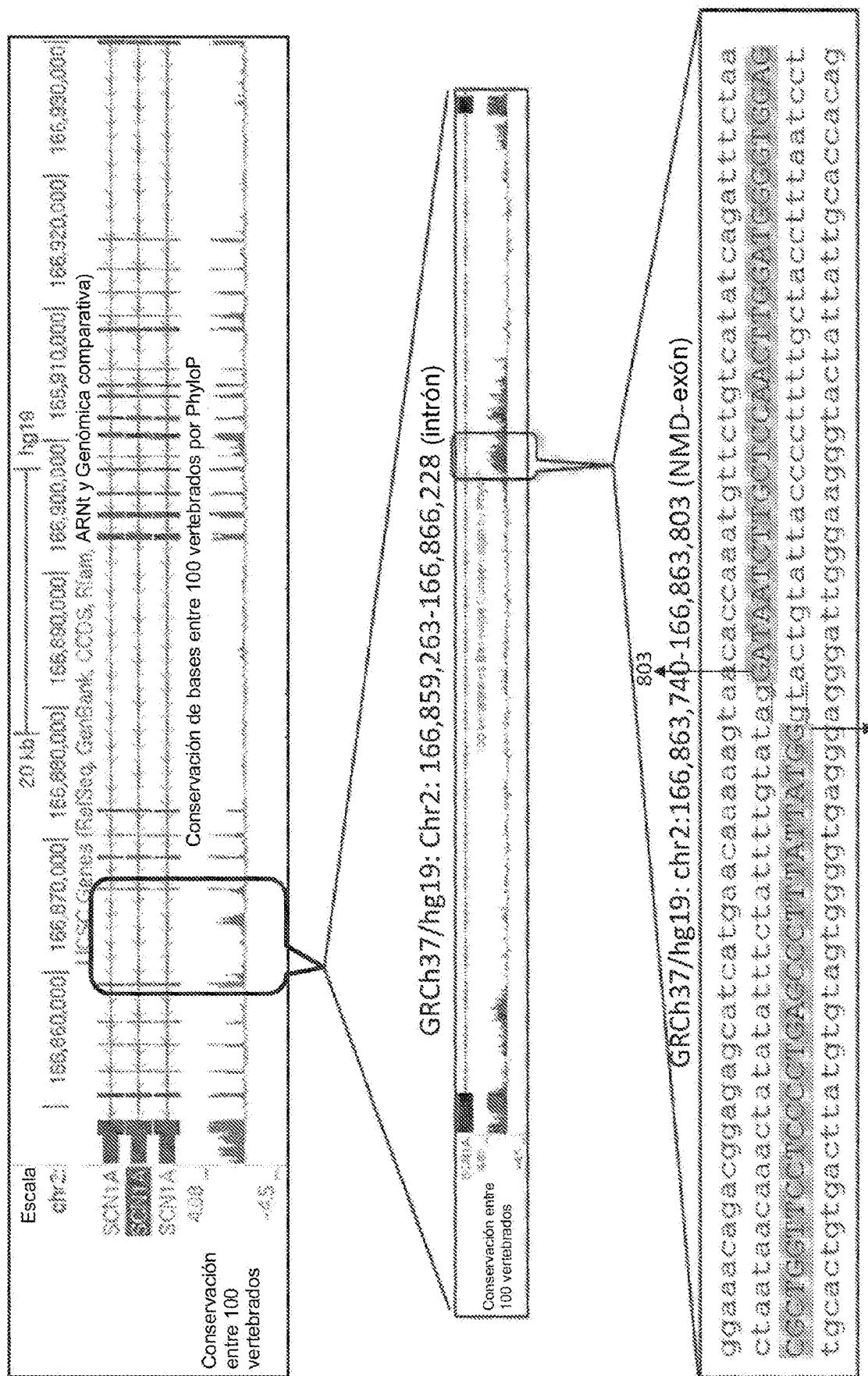


FIGURA 2

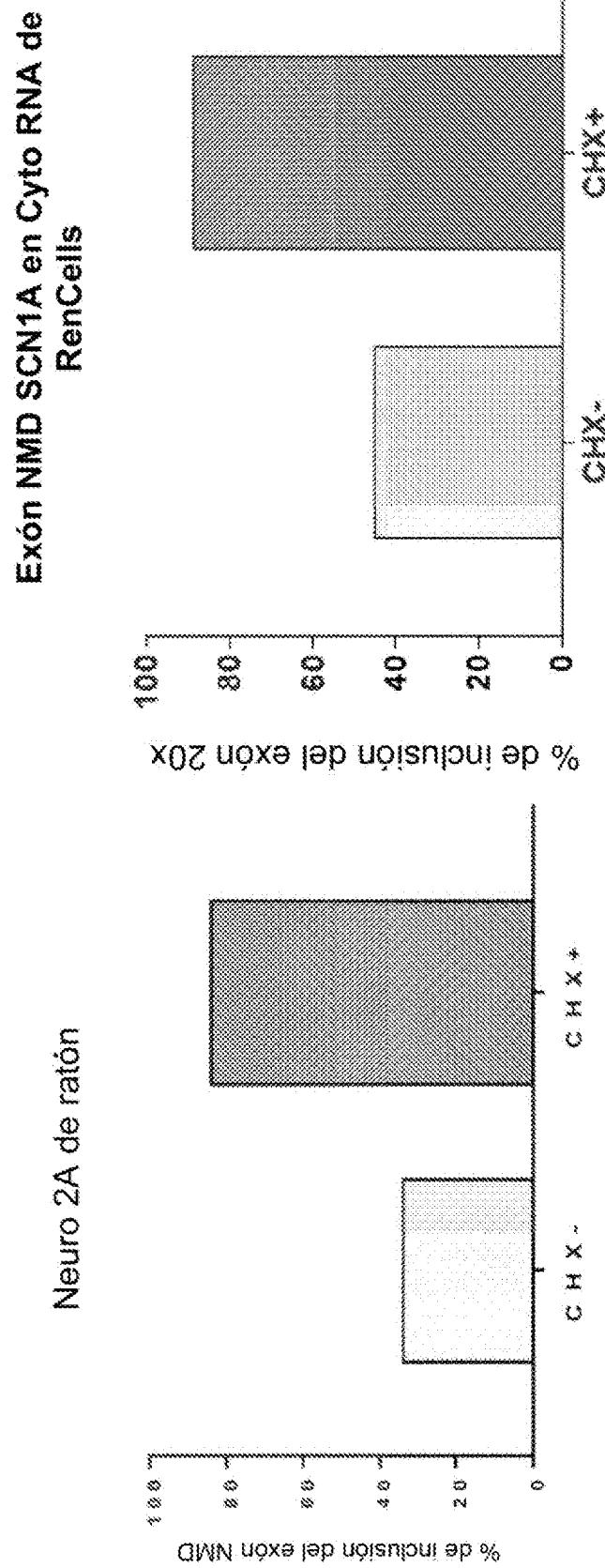


FIGURA 3A

FIGURA 3B

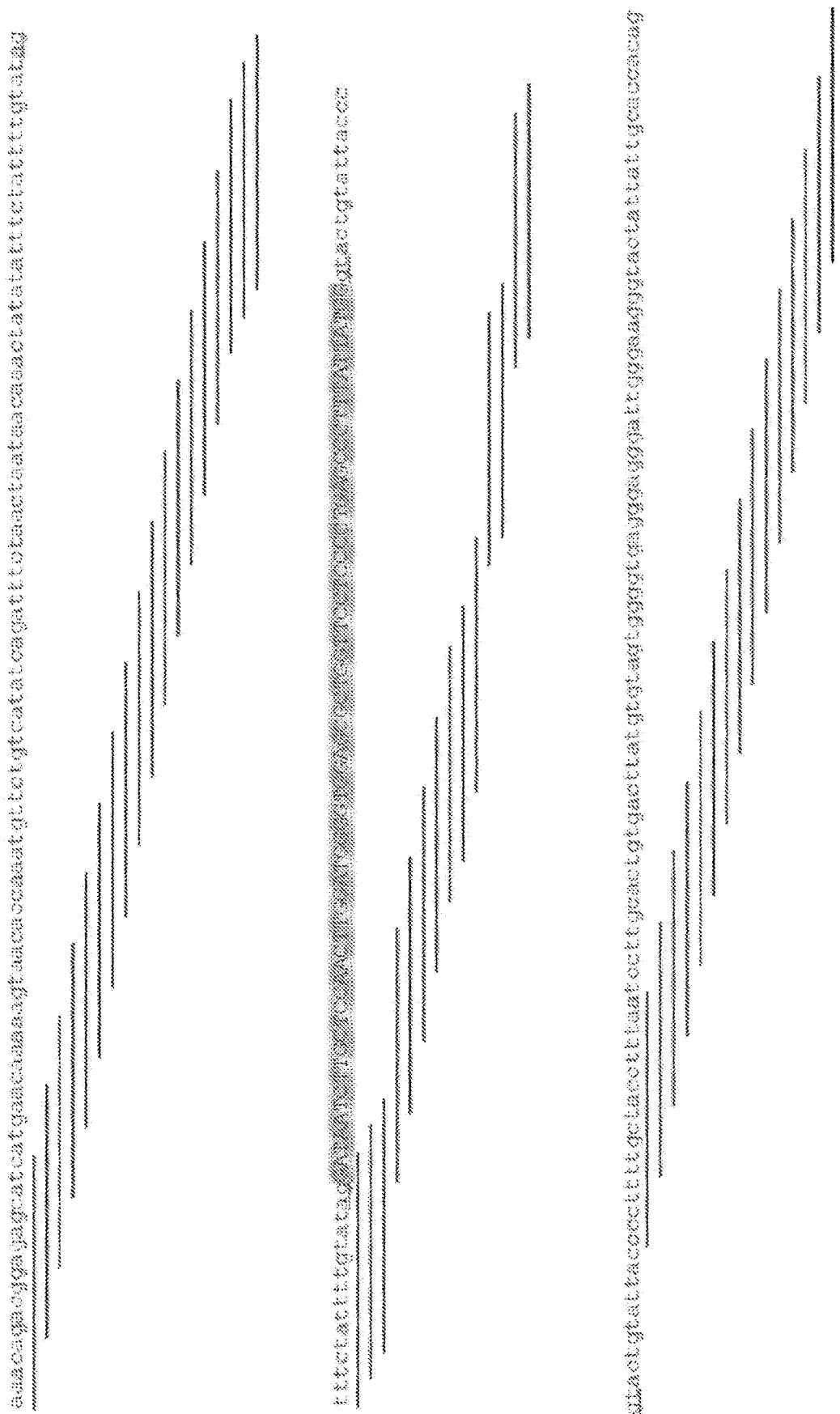


FIGURA 4

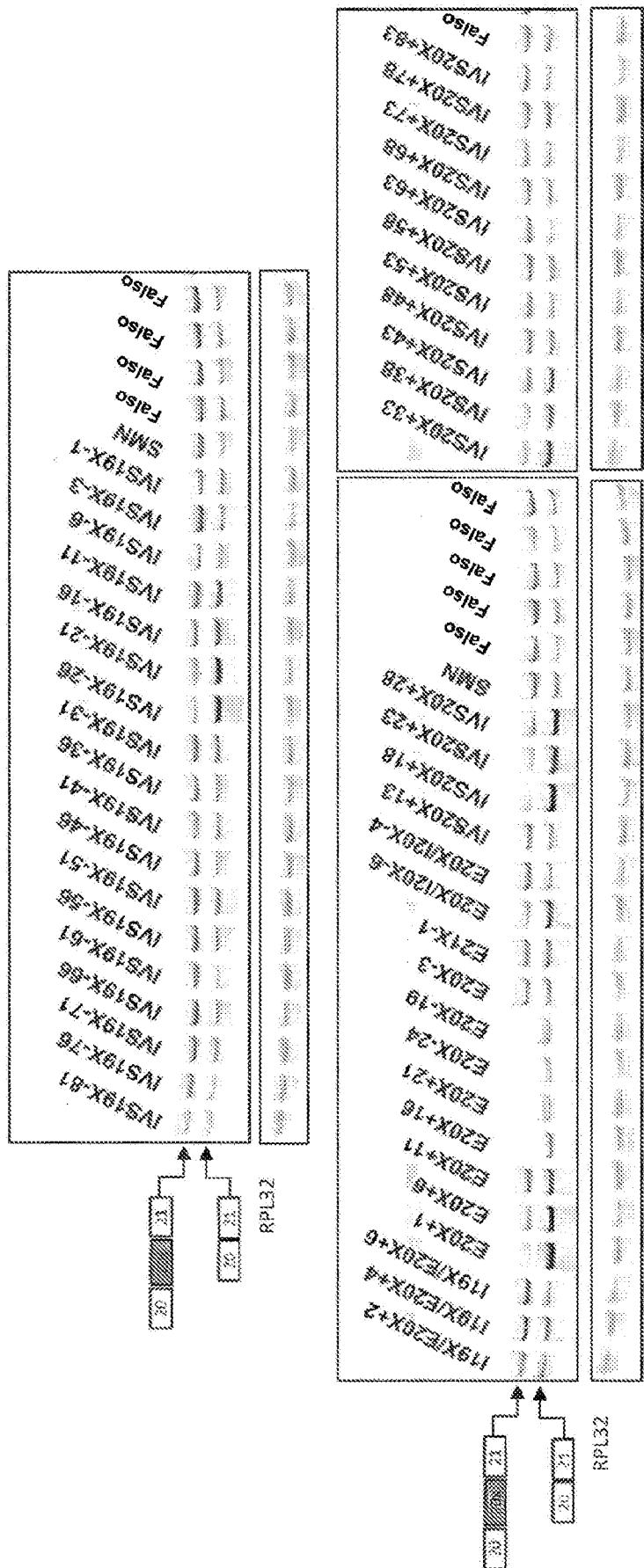


FIGURA 5A

% de inclusión del exón 20x

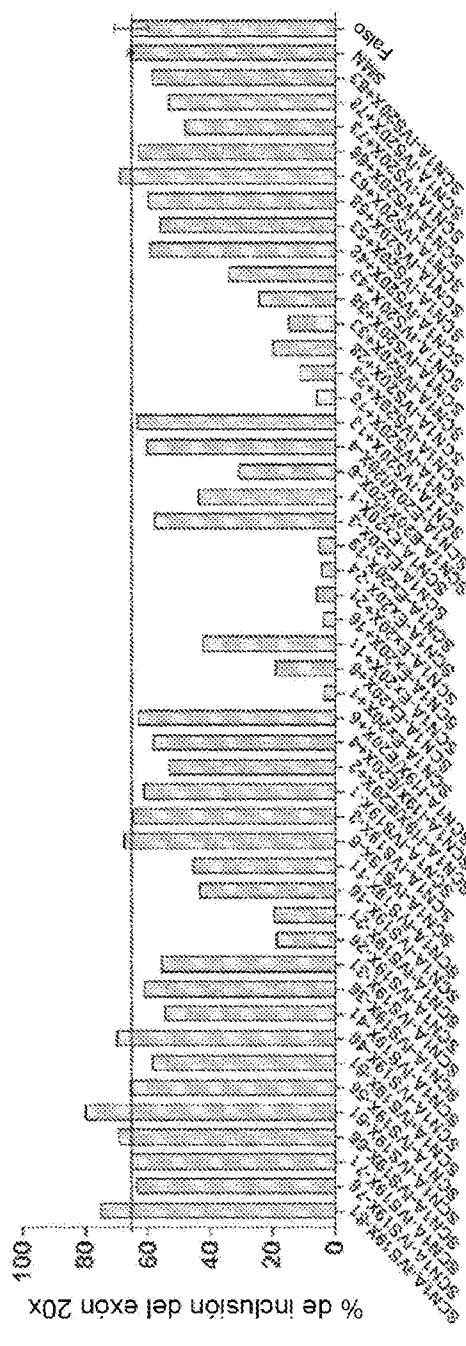


FIGURA 5B

Cambio en veces de longitud completa

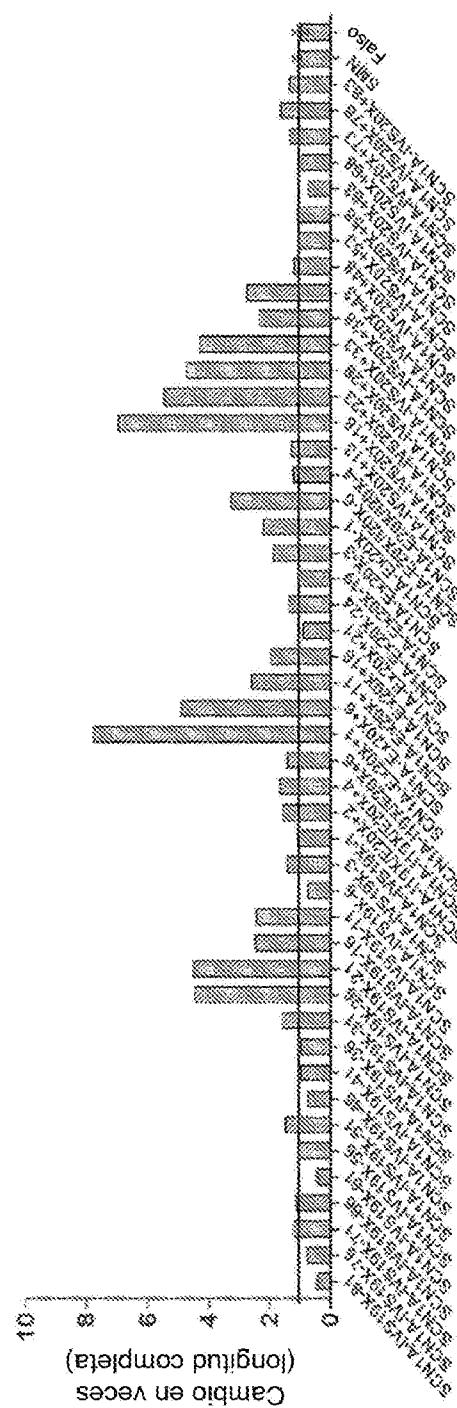


FIGURA 5C

ES 2 965 696 T3

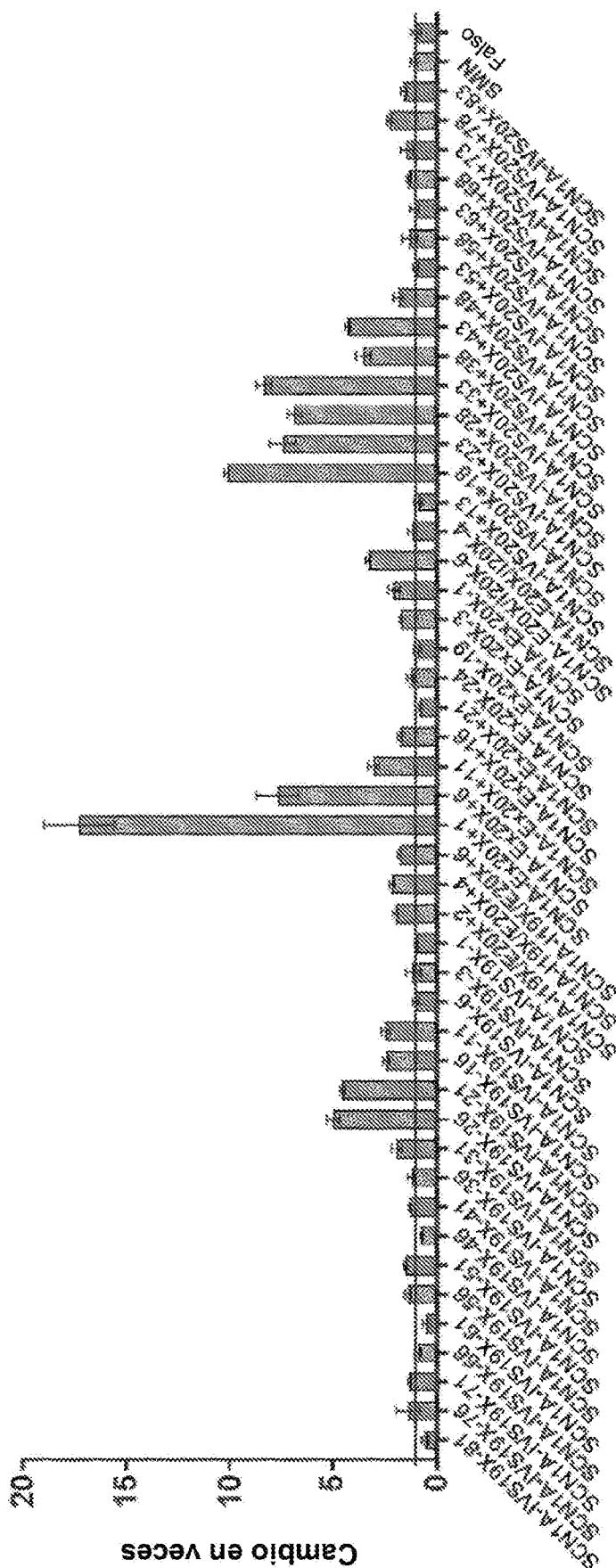


FIGURA 6

Subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje

Gen	Nombre aprobado	Cromosoma	
SCN1A	Subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje 1	2q24.3	↑
SCN2A	Subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje 2	2q24.3	↔
SCN3A	Subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje 3	2q24.3	↔
SCN7A	Subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje 7	2q24.3	X
SCN8A	Subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje 8	12q13.13	↑
SCN9A	Subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje 9	2q24.3	↔
SCN10A	Subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje 10	3p22.2	X
SCN11A	Subunidad alfa del canal de sodio dependiente de voltaje 11	3p22.2	X

X: no se detectó expresión

FIGURA 7A

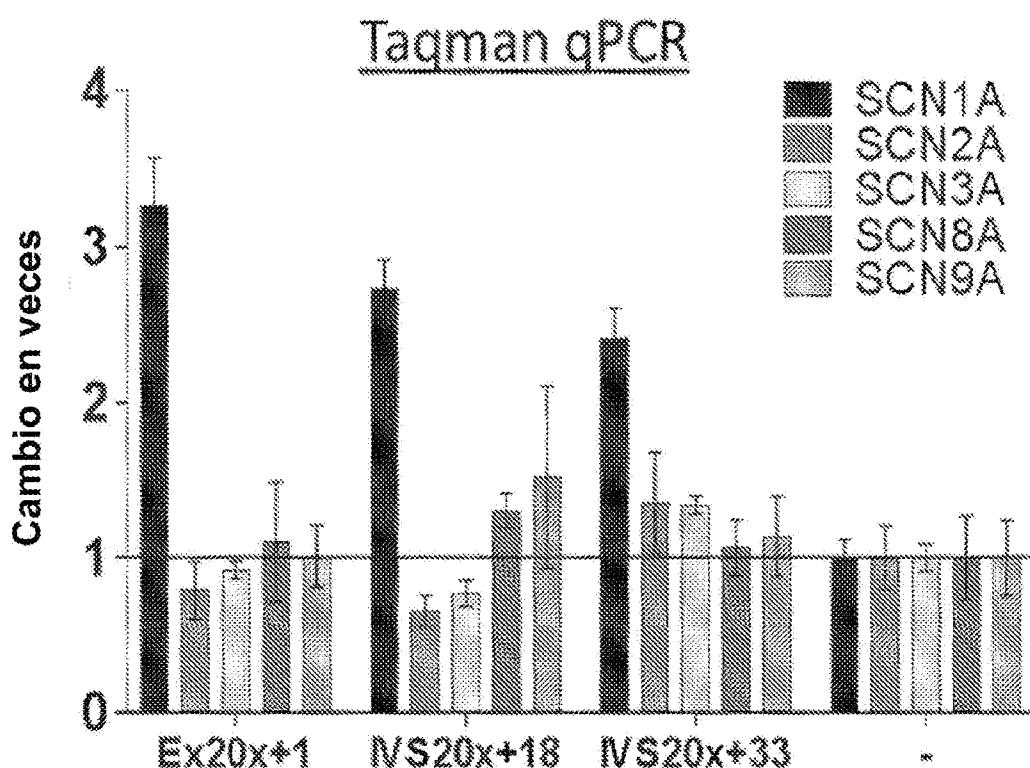


FIGURA 7B

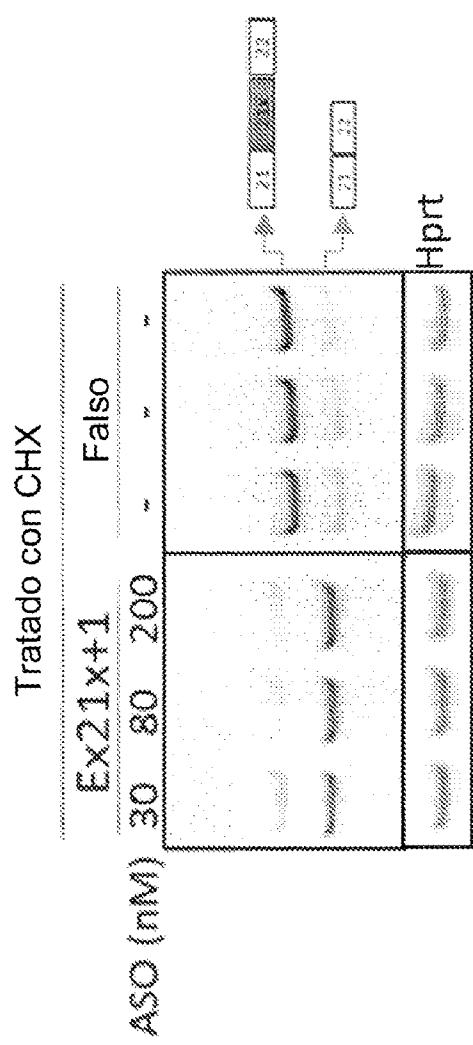


FIGURA 8A

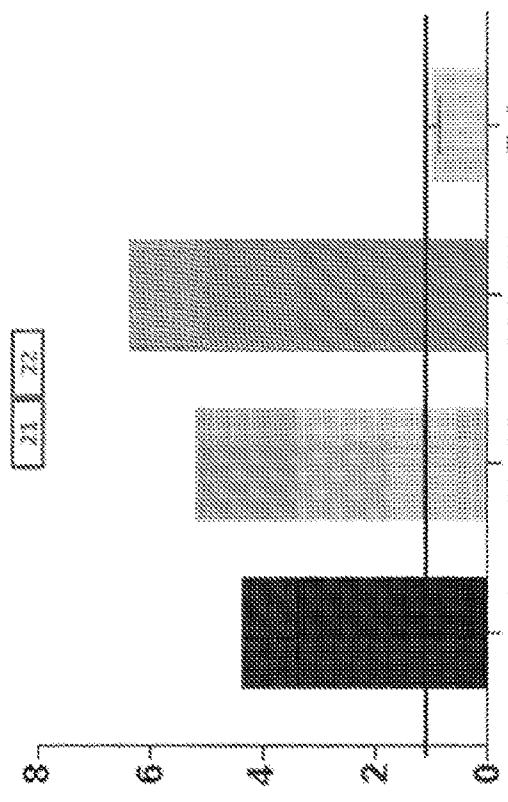


FIGURA 8C

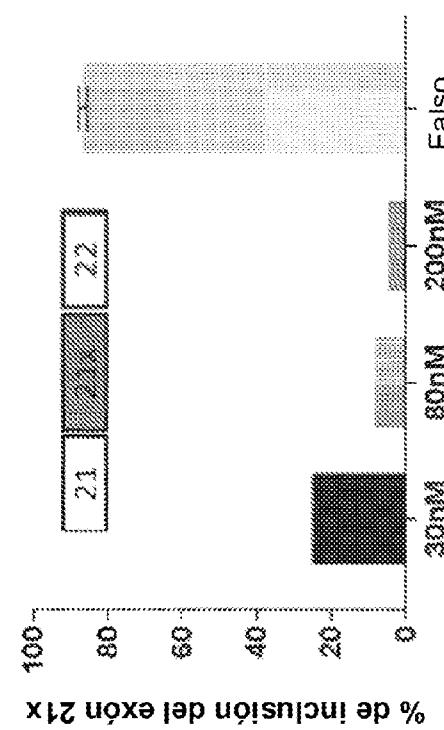


FIGURA 8B

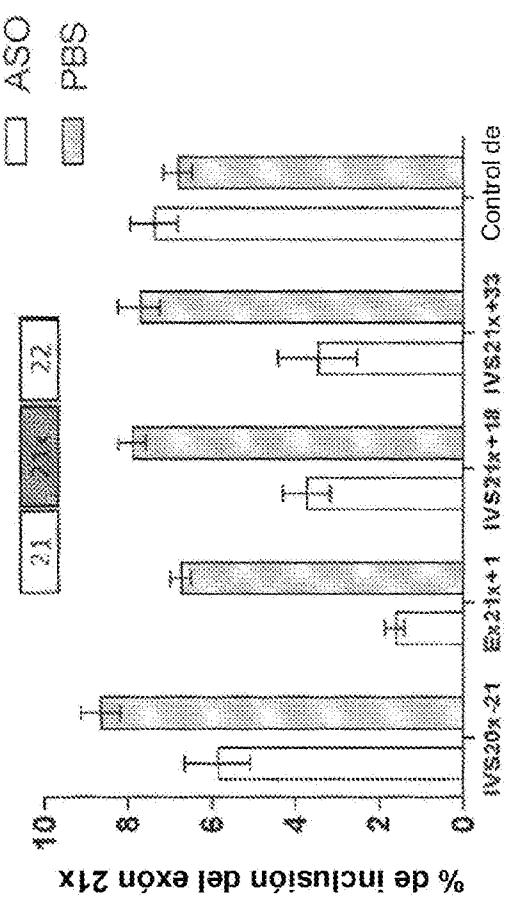


FIGURA 9B

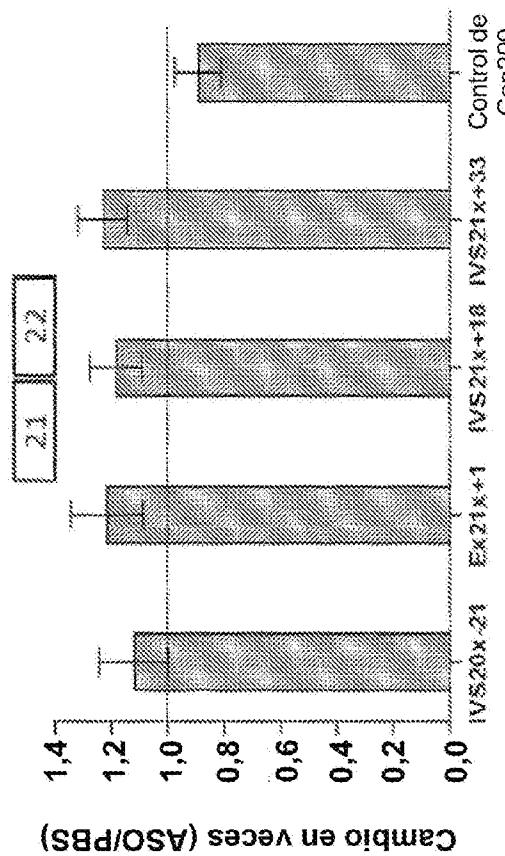


FIGURA 9C

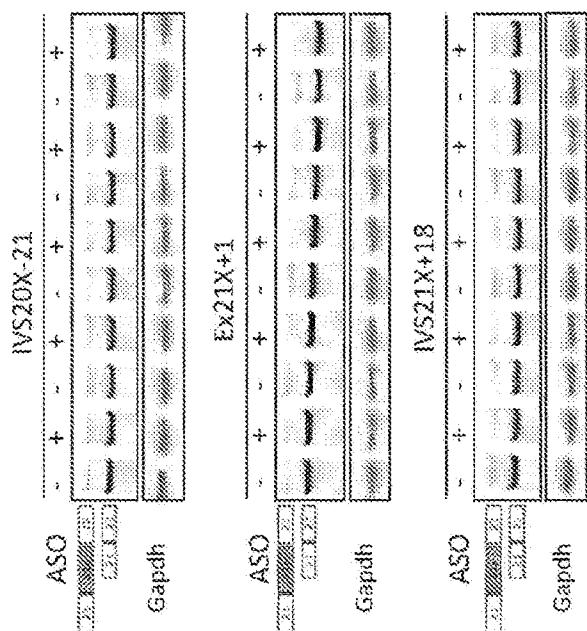


FIGURA 9A

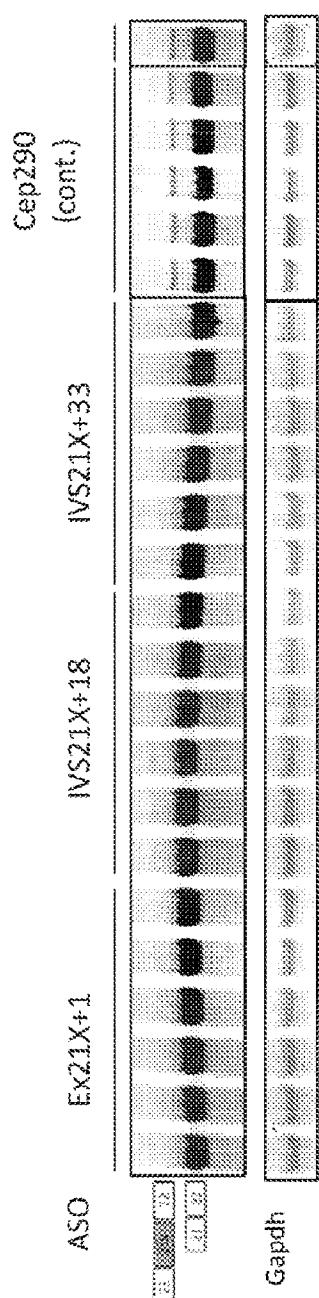


FIGURA 10A

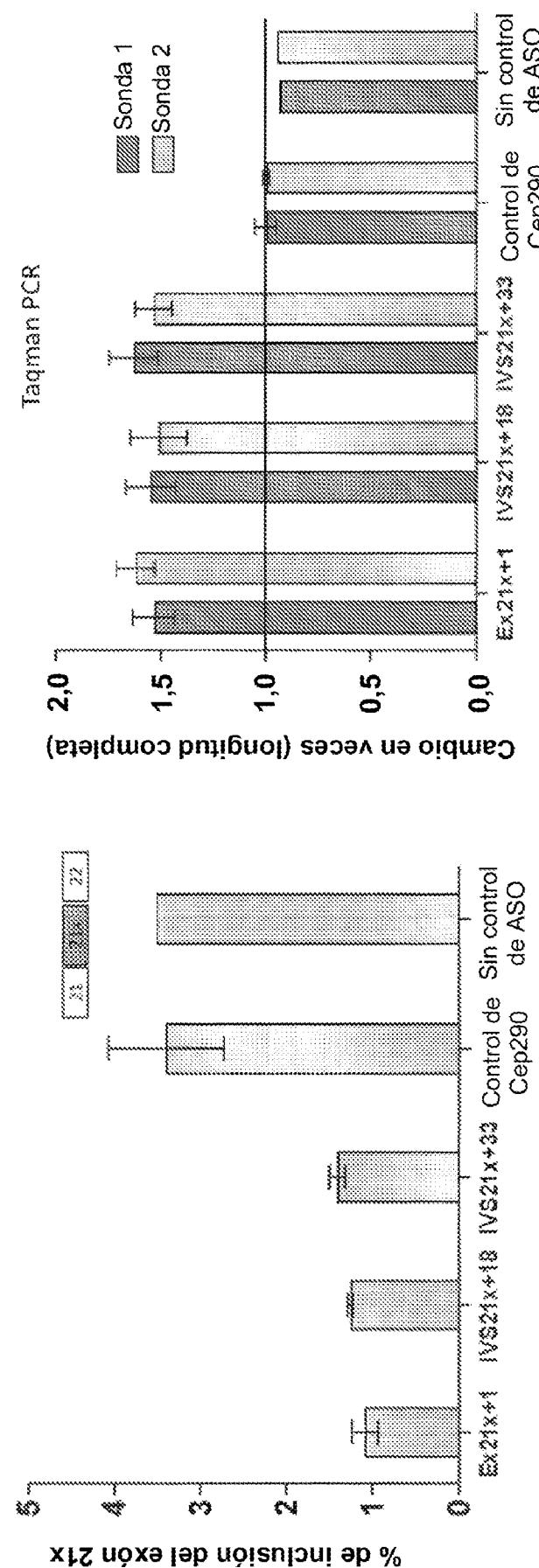


FIGURA 10B

FIGURA 10C

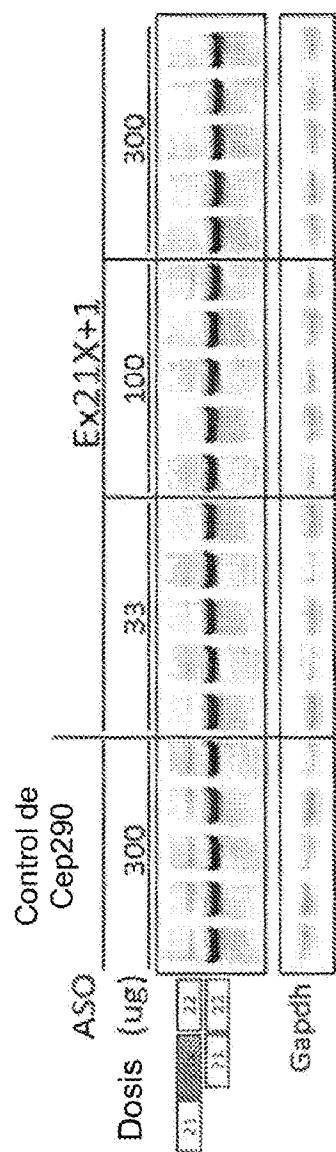


FIGURA 11A

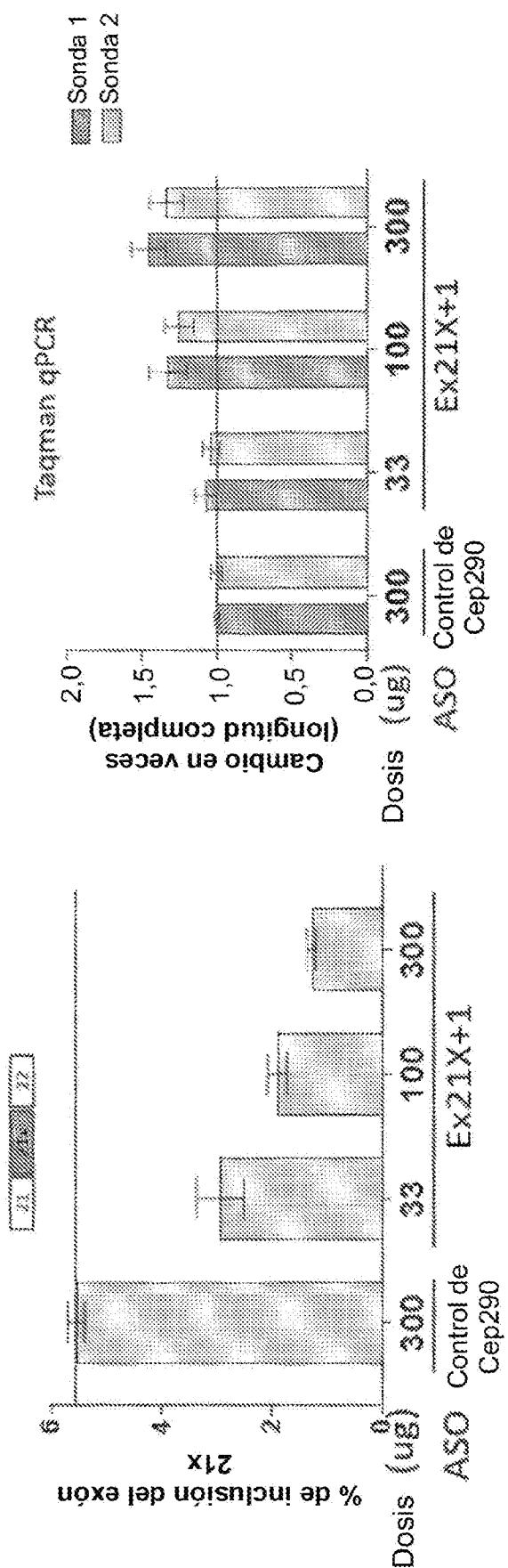


FIGURA 11B

FIGURA 11C

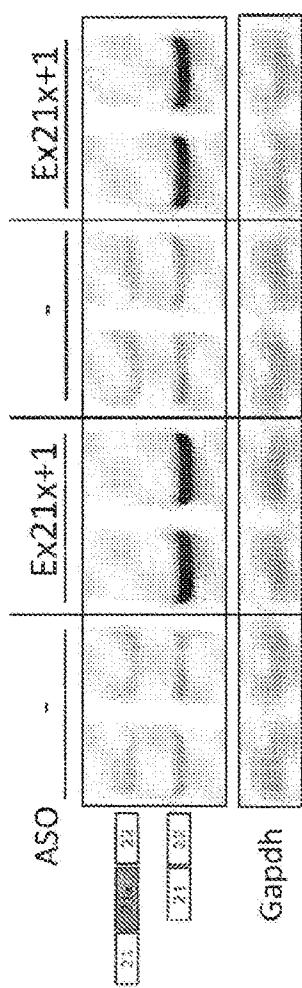
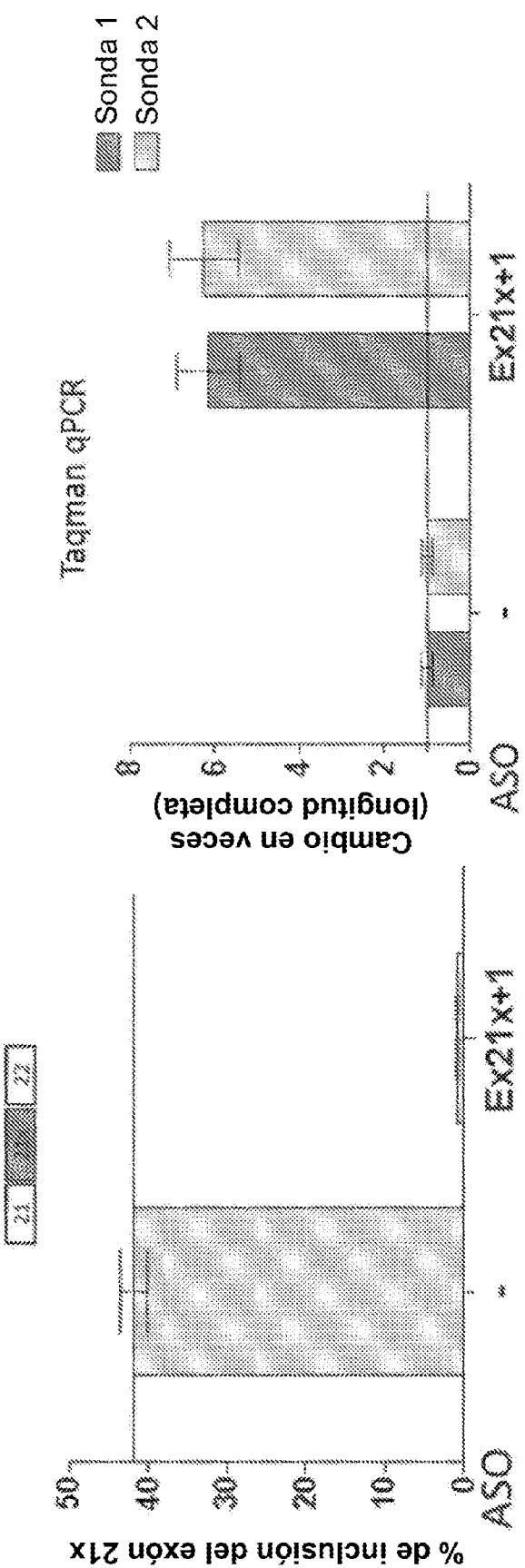


FIGURA 12A



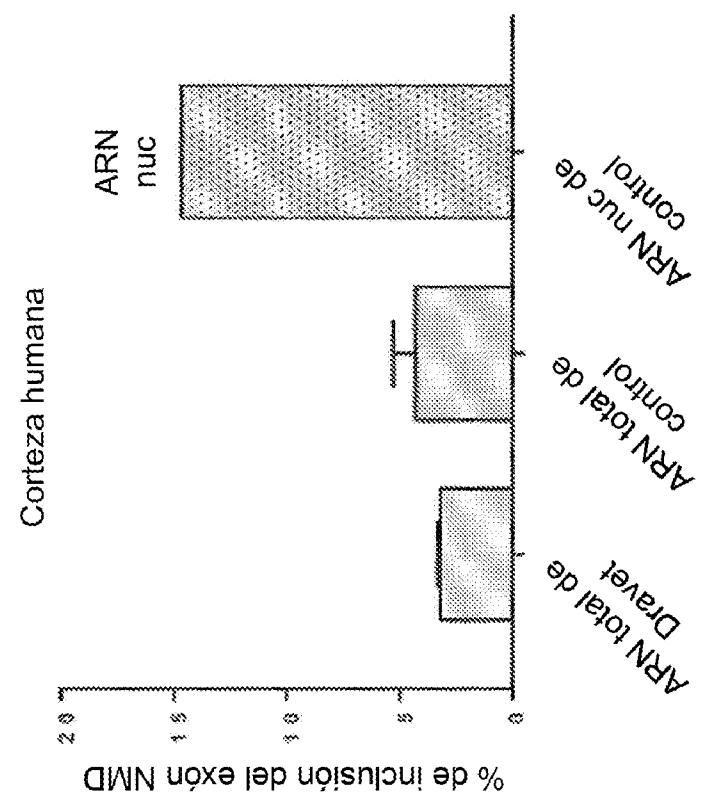


FIGURA 13B

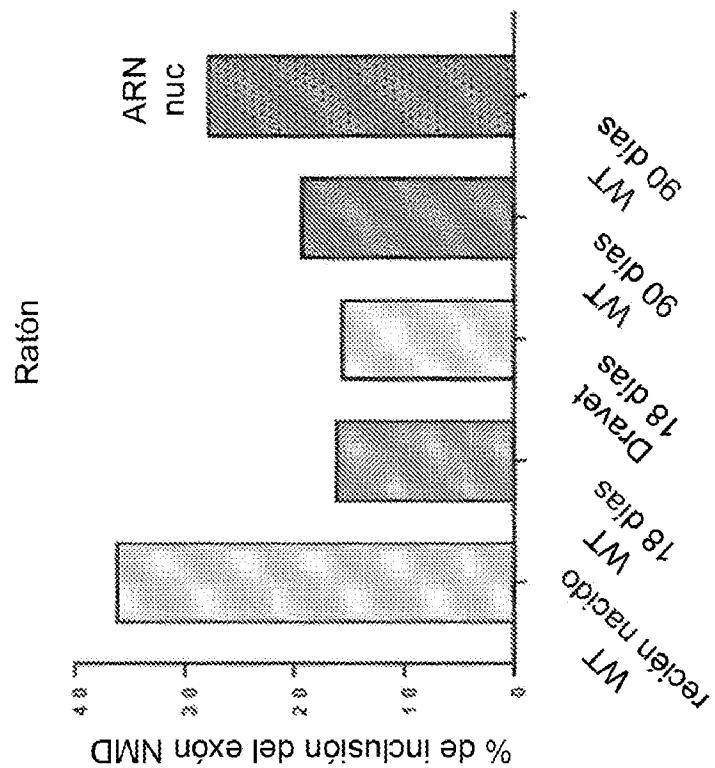
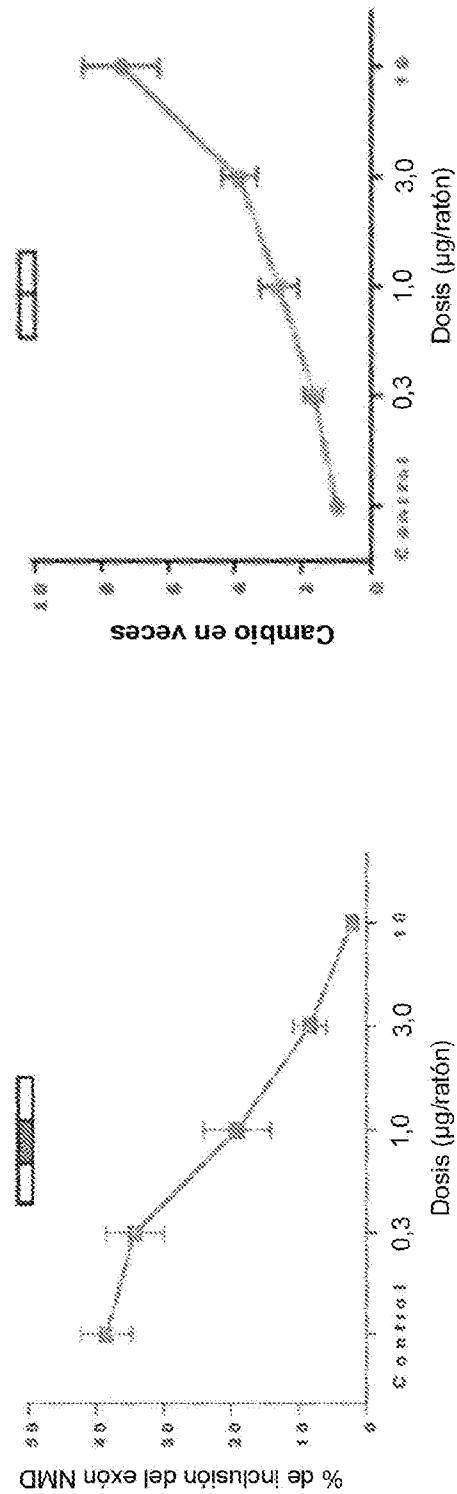
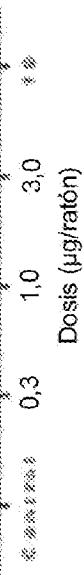
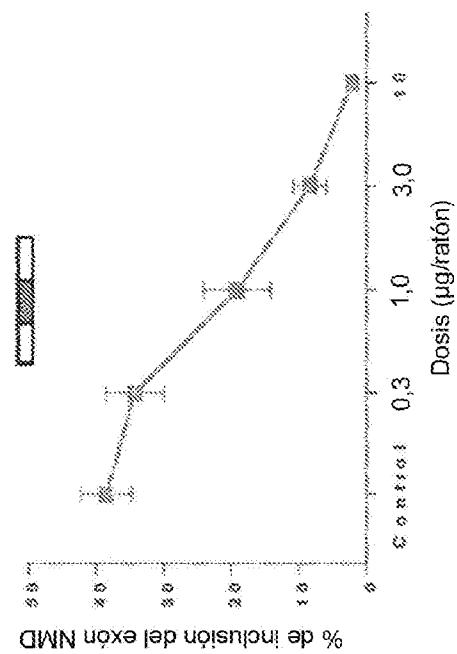


FIGURA 13A

Aumento del ARNm de *Son1a* – Tagman qPCR

Disminución en el exón NMD – RT-PCR /SYBR-safe®



Aumento de la proteína Nav1.1

FIGURA 14B**FIGURA 14C**

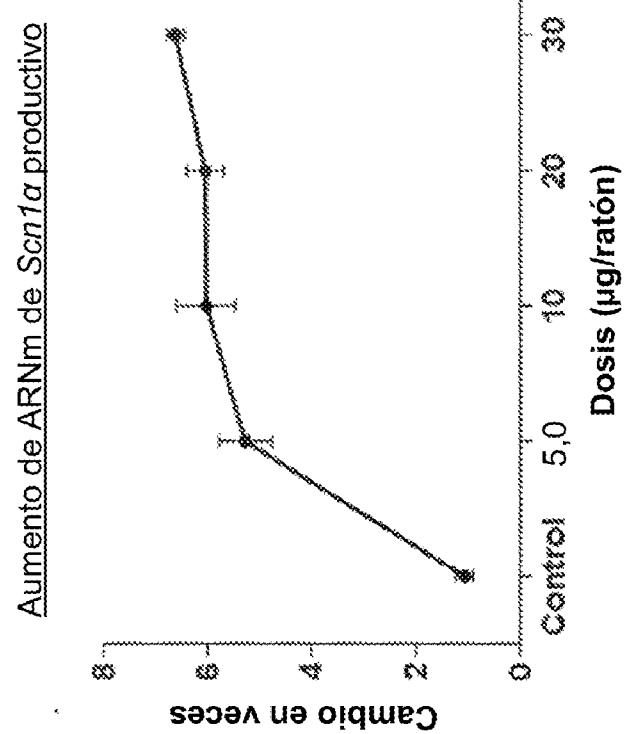


FIGURA 15B

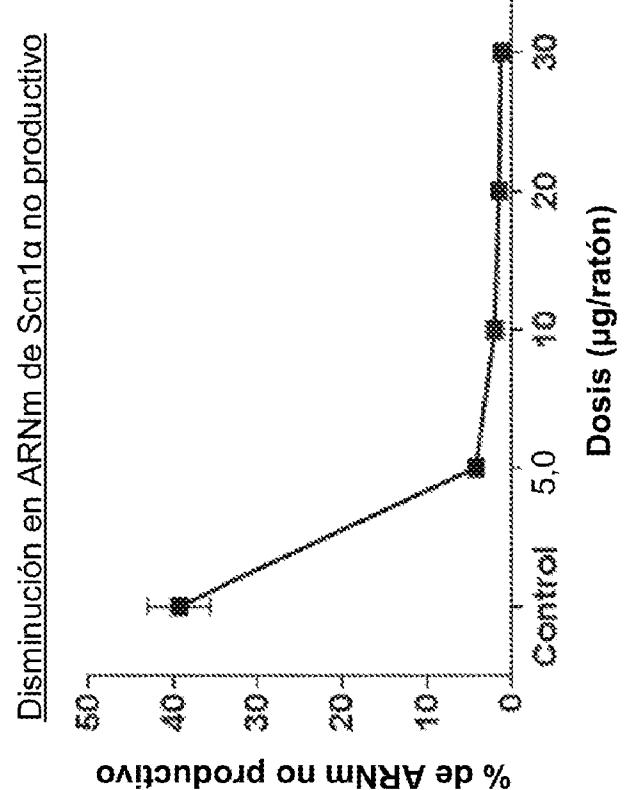


FIGURA 15A

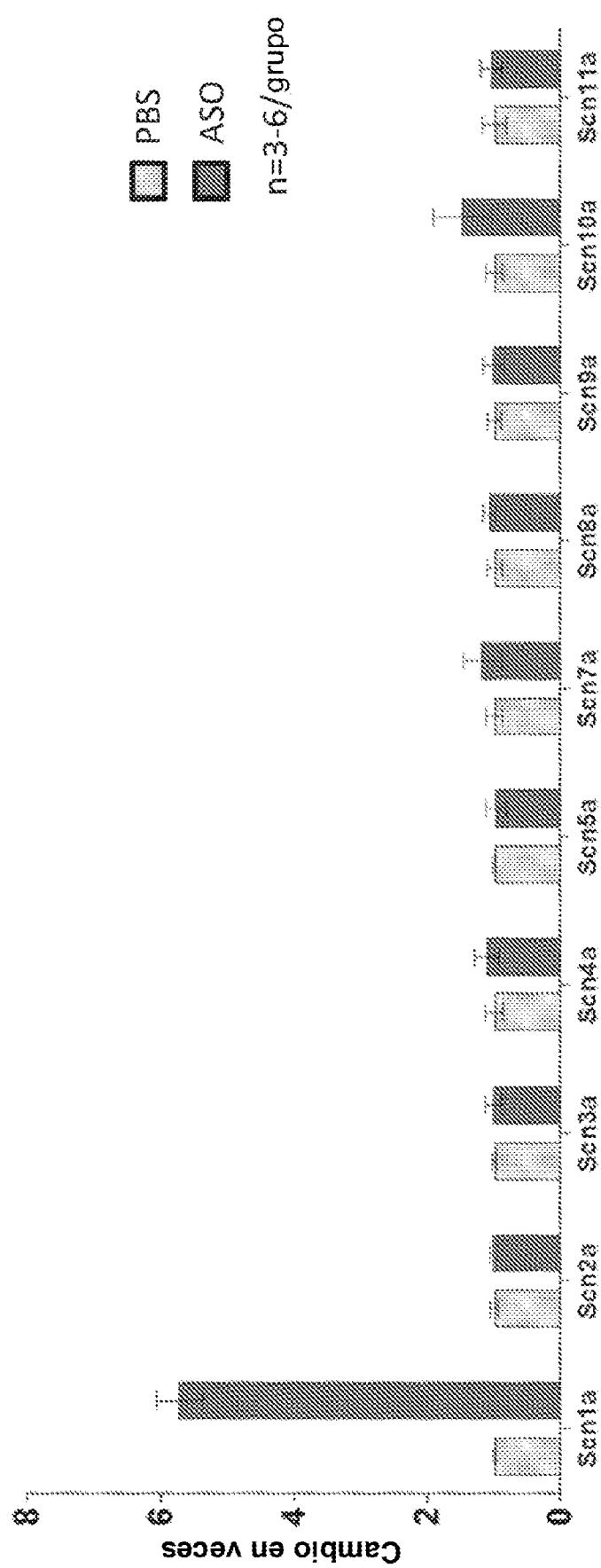


FIGURA 16

Aumento de la proteína $\text{Na}_v1.1$ – trasferencia western

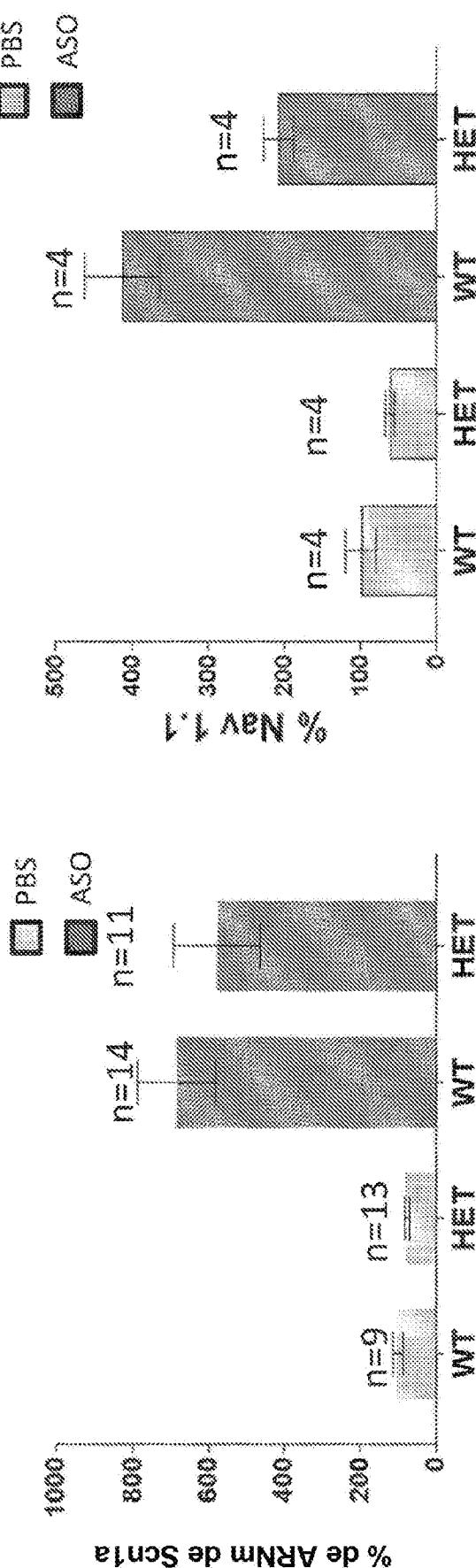


FIGURA 17A

FIGURA 17B

ES 2 965 696 T3

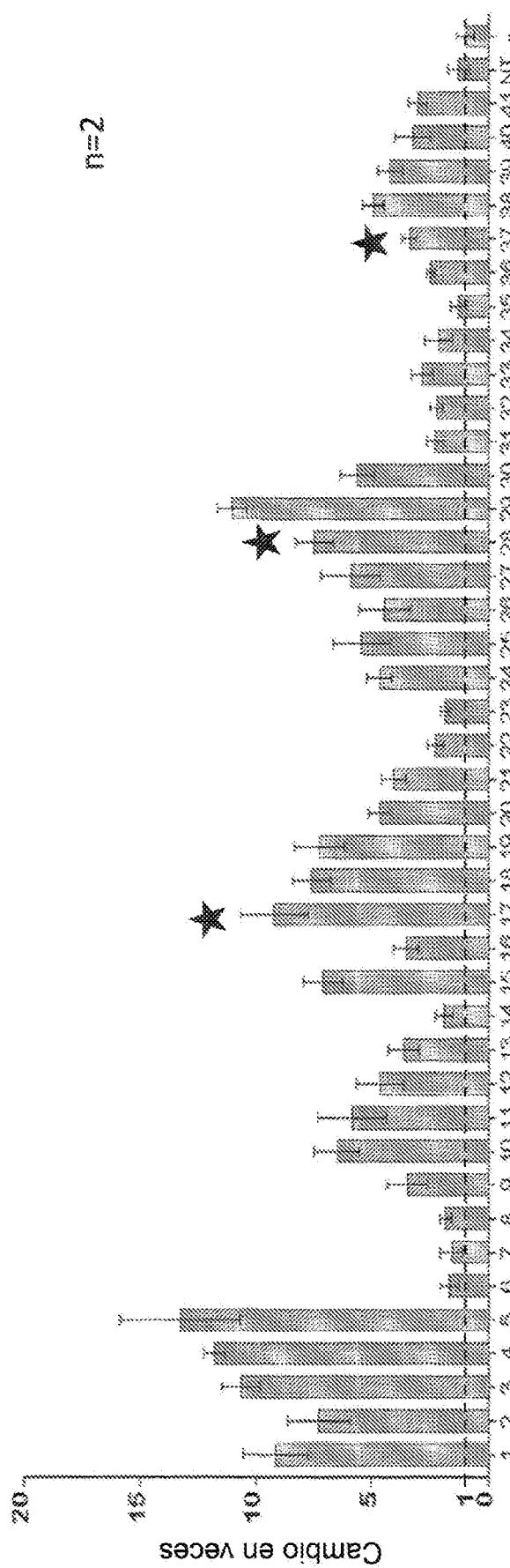


FIGURA 18

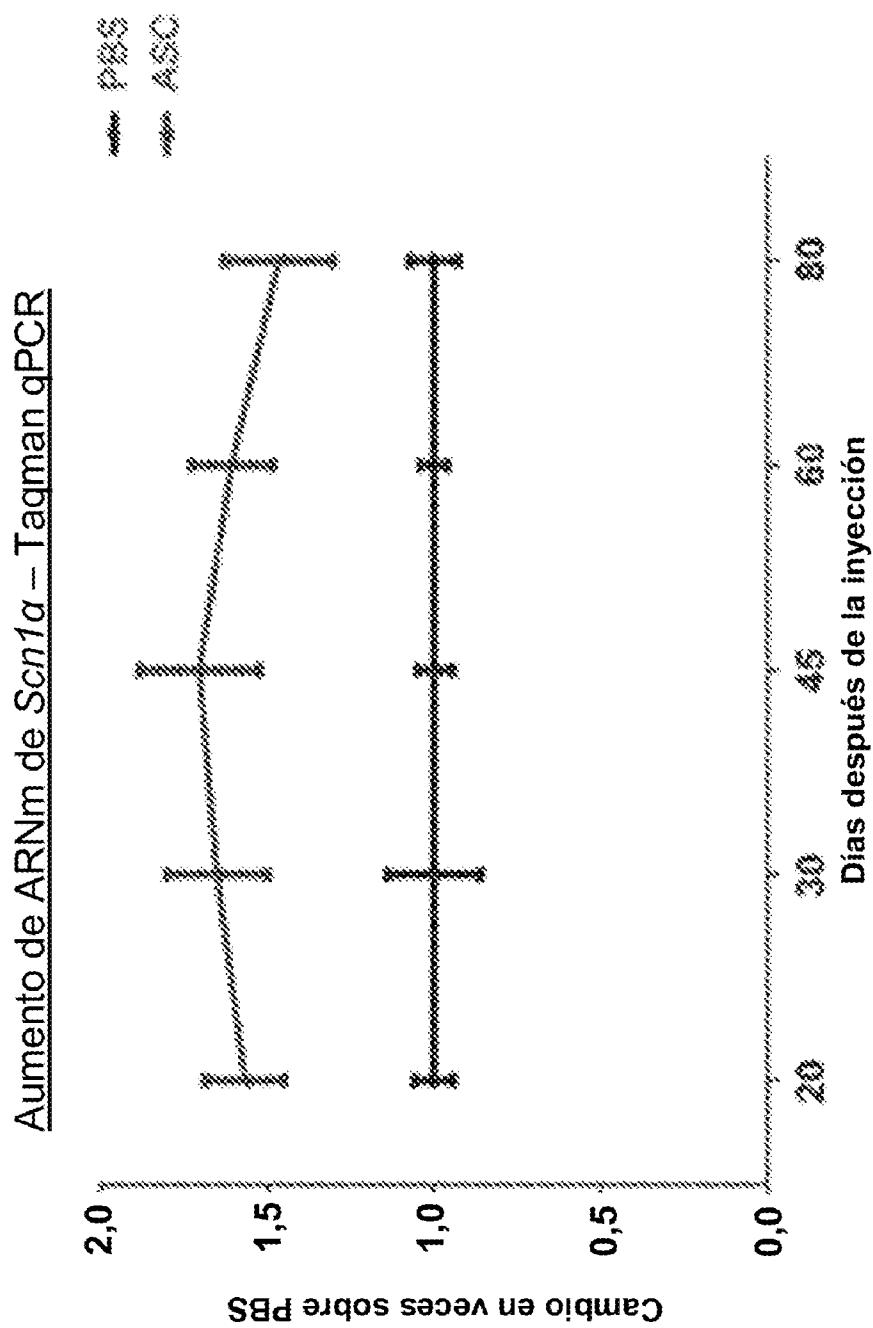


FIGURA 19

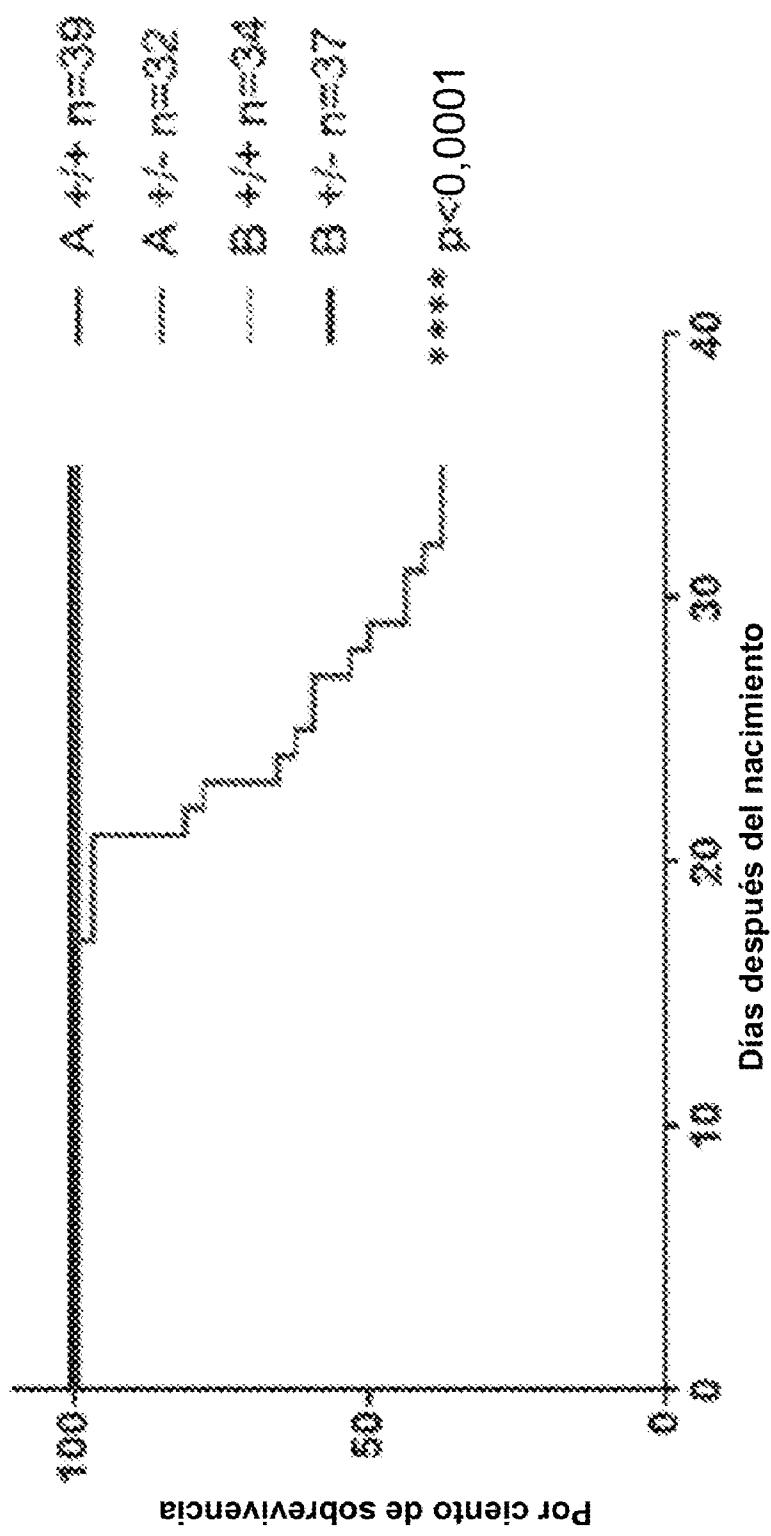


FIGURA 20