

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 850**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2014 PCT/EP2014/069325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15036451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2014 E 14761668 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 3044315**

54 Título: **Ácidos nucleicos y procedimientos para el tratamiento de la enfermedad de Pompe**

30 Prioridad:

**11.09.2013 EP 13184013**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.02.2020**

73 Titular/es:

**SYNTHENA AG (100.0%)  
Department of Chemistry and Biochemistry,  
University of Bern, Freiestrasse 3  
3012 Bern, CH**

72 Inventor/es:

**GARCIA, LUIS y  
AVRIL, AURÉLIE**

74 Agente/Representante:

**PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén**

ES 2 739 850 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

Ácidos nucleicos y procedimientos para el tratamiento de la enfermedad de Pompe

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La invención se refiere a ácidos nucleicos y procedimientos para restablecer la actividad de la alfa-glucosidasa alfa (GAA) en pacientes con enfermedad de Pompe usando tecnología de modulación de ajuste. En particular, la invención proporciona procedimientos para permitir la inclusión normal del exón 2 en el ARNm de la GAA en  
 10 pacientes con enfermedad de Pompe con la mutación c.-32 IVS1-13 T>G que causa una omisión perjudicial del exón 2, que engloba el codón de iniciación ATG del transcrito de GAA. Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento para el montaje de un ARNm de la GAA funcional por medio de oligonucleótidos antisentido  
 15 compatibles con la administración sistémica para acceder a todos los tejidos afectados por todo el cuerpo (músculos estriados, corazón e hígado). Dicho enfoque satisface las necesidades terapéuticas de más de la mitad de todos los pacientes adultos de raza blanca con enfermedad de Pompe.

## ANTECEDENTES

15 La enfermedad de Pompe (o enfermedad de almacenamiento de glucógeno de tipo II - GSD II) está causada por mutaciones patógenas en el gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida (GAA) situado en el cromosoma 17. El gen GAA abarca más de 20 000 pares de bases. Contiene 20 exones que dan lugar a un ARNm de longitud completa de aproximadamente 3,6 kb, traducido del codón de iniciación situado en el exón 2 como un precursor inactivo de aproximadamente 110 kD, que se procesa adicionalmente en formas maduras de 70-77 kD. El modo de herencia de la enfermedad es recesivo: los pacientes tienen dos mutaciones patógenas en el gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida, una  
 20 en cada alelo. Básicamente, la naturaleza misma de las mutaciones que afectan al gen GAA conjuntamente con la combinación de los alelos mutantes determinan el nivel de actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida lisosomal residual y la subsiguiente gravedad clínica. En la mayoría de los casos, una combinación de dos alelos con mutaciones completamente perjudiciales da lugar a la práctica ausencia de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa ácida y al fenotipo en lactantes clásico grave. Una mutación grave en un alelo y una mutación más leve en el otro dan como resultado un fenotipo progresivo más lento con una actividad residual de hasta un 23% de actividad de control promedio. Sin embargo, para estos pacientes, la actividad enzimática no siempre es predictiva de la edad de aparición y la  
 25 progresión de la enfermedad.

Se han identificado cientos de mutaciones de GAA, pero algunas son más comunes entre grupos étnicos dados. Por ejemplo:

- 30
- c.-32 IVS1-13T>G es una mutación de ajuste que se encuentra en más de la mitad de todos los pacientes adultos de raza blanca.
  - Asp645Glu se encuentra en la mayoría de los bebés de Taiwán con enfermedad de Pompe.
  - La mutación terminadora Arg854X se encuentra en muchos bebés africanos o afroamericanos afectados.
  - del525T y del en el exón 18 se ven comúnmente en los bebés holandeses con la enfermedad.

35 Todos los pacientes con la mutación común "c.-32 IVS1-13T>G" (una mutación de ajuste que disminuye drásticamente, pero no por completo, la inclusión del exón 2 en el transcrito final - mutación parcial), combinada con una mutación completamente perjudicial en el otro alelo, muestran una actividad enzimática residual significativa y una evolución prolongada de la enfermedad, pero la aparición de los síntomas variaba desde el 1.<sup>er</sup> año de vida hasta la edad adulta tardía (Kroos M, *et al.*; Am J Med Genet Part C Semin Med Genet 2012, 160C:59-68; Kroos M, *et al.*, Neurology 2007, 68:110-115; Raben N, *et al.*; Hum Mol Genet, 1996, 5(7):995-1000).

40 La enfermedad de Pompe ha sido durante mucho tiempo un trastorno intratable, para el que solo se disponía de tratamiento sintomático. En marzo de 2006, Myozyme (fabricado por Genzyme), el primer tratamiento para pacientes con enfermedad de Pompe, recibió la autorización de comercialización en la Unión Europea, seguida en abril de 2006 por la aprobación de la FDA en los Estados Unidos. Myozyme es un "tratamiento de restitución de enzimas" (RRE), que se suministra por administración intravenosa de la enzima faltante. Otro enfoque consiste en el  
 45 tratamiento génico. El fundamento del tratamiento génico es introducir un gen que codifica la enzima de restitución en las células somáticas, creando, por tanto, una fuente permanente de la enzima. Con este fin, la secuencia codificante de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana se inserta en un vector vírico. Para la enfermedad de Pompe, el tratamiento génico con vectores adenovíricos (Ad), adenoasociados (AAV) e híbridos Ad-AAV se ha investigado en  
 50 ratas, ratones y codornices. Hasta ahora, los resultados preclínicos en modelos animales son alentadores, pero la expresión sostenida del transgén terapéutico, la prevención de la formación de anticuerpos contra el vector vírico y/o la  $\alpha$ -glucosidasa ácida, así como los problemas de seguridad todavía son cuestionables. Otro enfoque usó tratamiento con chaperonas. Algunas de las mutaciones patógenas en el gen de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida dan lugar a formas anómalas de la enzima que se transportan mal al lisosoma o son inestables en el entorno lisosomal. El  
 55 fundamento del tratamiento con chaperonas es que algunas moléculas pequeñas pueden tener la propiedad de

estabilizar y, por lo tanto, potenciar la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida residual en los lisosomas de pacientes con este tipo de mutaciones. El efecto de las chaperonas químicas hasta ahora solo se ha sometido a prueba en fibroblastos cultivados de pacientes con enfermedad de Pompe (Okumiya, Mol Genet Metab 2007; 90:49-57).

5 Byrne *et al.* (Hum Mol Gen, 2011, 20:61-68) han descrito la expresión de adenovirus recombinantes de la alfa glucosidasa ácida (GAA) para el tratamiento génico y Douillard-Guilloux *et al.* (Hum Mol Gen, 2010, 19:684-696) han descrito ratones con inactivación doble de la GAA y la glucógeno sintasa 1 (GAA/GYS1-KO) como modelo murino de la enfermedad de Pompe.

10 Es evidente que, aunque se han propuesto diferentes estrategias para tratar la enfermedad de Pompe, como se resume anteriormente, todavía existe la necesidad de un enfoque terapéutico eficaz para tratar la forma más frecuente de la enfermedad.

### SUMARIO DE LA INVENCION

15 La presente invención se refiere a un ácido nucleico de 10 a 50 nucleótidos de longitud, complementario de una secuencia de nucleótidos del preARMm de la alfa-glucosidasa ácida (GAA), pudiendo corregir dicho ácido nucleico el ajuste del exón 2 del preARMm de la alfa-glucosidasa alfa, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende, o preferentemente consiste en, una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA. Como se mostrará a continuación, el ácido nucleico de la invención es un oligonucleótido antisentido útil para tratar la enfermedad de Pompe. En un modo de realización particular, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia de silenciadores exónicos (ESS) presente en el exón 2 del preARNm que codifica la alfa-glucosidasa ácida.

20 En un modo de realización particular, la molécula de ácido nucleico de la invención comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 35 nucleótidos, preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1).

30 En otro modo de realización preferente, la molécula de ácido nucleico de la invención comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, preferentemente de 13 a 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 25 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1).

40 En otro modo de realización preferente, la molécula de ácido nucleico de la invención comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, preferentemente de 13 a 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 25 nucleótidos, y en el que dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1).

45 Por tanto, en un modo de realización preferente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, en el que dicha molécula de ácido nucleico tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos y es complementaria de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida (GAA), y en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido y puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida, y en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 35 nucleótidos, preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y, lo más preferentemente, dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 15 nucleótidos.

55 De nuevo en otro modo de realización preferente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, en el que dicha molécula de ácido nucleico tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos y es complementaria de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida (GAA), y en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido y puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida, y en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la

región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN o un 2'-O-metil-ARN, en el que la cadena principal de fosfatos de dicho oligonucleótido antisentido está compuesta únicamente por enlaces fosfodiéster, únicamente enlaces fosforotioato o combinaciones de enlaces fosfodiéster y fosforotioato. Preferentemente, dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN o un 2'-O-metil-ARN, en el que la cadena principal de fosfatos de dicho oligonucleótido antisentido está compuesta únicamente por enlaces fosfodiéster. También son preferentes modos de realización en los que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN o un 2'-O-metil-ARN, en los que la cadena principal de fosfatos de dicho oligonucleótido antisentido está compuesta únicamente por enlaces fosforotioato. En otro modo de realización preferente, dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN o un 2'-O-metil-ARN, en el que la cadena principal de fosfatos de dicho oligonucleótido antisentido está compuesta por combinaciones de enlaces fosfodiéster y fosforotioato. Además, preferentemente, dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 35 nucleótidos, preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y, lo más preferentemente, dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 15 nucleótidos.

De nuevo, en otro modo de realización preferente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, en la que dicha molécula de ácido nucleico tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos y es complementaria de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida (GAA), y en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido y puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida, y en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que, preferentemente, dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, preferentemente de 13 a 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 25 nucleótidos.

De nuevo en otro modo de realización preferente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, en el que dicha molécula de ácido nucleico tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos y es complementaria de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida (GAA), y en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido y puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida, y en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN o un 2'-O-metil-ARN, en el que la cadena principal de fosfatos de dicho oligonucleótido antisentido está compuesta únicamente por enlaces fosfodiéster, únicamente enlaces fosforotioato o combinaciones de enlaces fosfodiéster y fosforotioato. Preferentemente, dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN o un 2'-O-metil-ARN, en el que la cadena principal de fosfatos de dicho oligonucleótido antisentido está compuesta únicamente por enlaces fosfodiéster. También son preferentes modos de realización en los que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN o un 2'-O-metil-ARN, en los que la cadena principal de fosfatos de dicho oligonucleótido antisentido está compuesta únicamente por enlaces fosforotioato. En otro modo de realización preferente, dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN o un 2'-O-metil-ARN, en el que la cadena principal de fosfatos de dicho oligonucleótido antisentido está compuesta por combinaciones de enlaces fosfodiéster y fosforotioato. Además, preferentemente, dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, preferentemente de 13 a 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 25 nucleótidos.

En particular, el ácido nucleico de la invención puede ser complementario de una o más de las secuencias definidas por las posiciones 3-17, 7-21 o 17-31 en SEQ ID NO: 1 (que representa el exón 2 de GAA humano) o en una secuencia que tiene al menos un 90 % de homología con SEQ ID NO: 1. En un modo de realización particular, la molécula de ácido nucleico de la invención comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una o más de las secuencias definidas por las posiciones [+3;+17], [+7;+21] o [+17;+31] en SEQ ID NO: 1 o en una secuencia que tiene al menos un 90 % de homología con SEQ ID NO: 1, en particular al menos un 95 %, más particularmente al menos un 99 %. En otro modo de realización preferente de la presente invención, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una o más de las secuencias seleccionadas de (i) la secuencia definida por la posición [+3;+17] de SEQ ID NO: 1; (ii) la secuencia definida por la posición [+7;+21] de SEQ ID NO: 1; (iii) la secuencia definida por la posición [+17;+31] de SEQ ID NO: 1; (iv) una secuencia que tiene al menos un 90 % de homología, preferentemente al menos un 95 % de homología, y, aún más preferentemente, al menos un 99 % de homología con la secuencia definida en (i), (ii) o (iii). Además, preferentemente, dicha secuencia tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, preferentemente de 13 a 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 25 nucleótidos.

Por tanto, en un modo de realización preferente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, en el que dicha molécula de ácido nucleico tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos y es complementaria de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida (GAA), y en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido y puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida, y en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una o más de las secuencias seleccionadas de (i) la secuencia definida por la posición [+3;+17] de SEQ ID NO: 1; (ii) la secuencia definida por la posición [+7;+21] de SEQ ID NO: 1; (iii) la secuencia definida por la

posición [+17;+31] de SEQ ID NO: 1; (iv) la secuencia definida por la posición [+3;+31] de SEQ ID NO: 1; (v) la secuencia definida por la posición [+3;+45] de SEQ ID NO: 1; (vi) la secuencia definida por la posición [+3;+46] de SEQ ID NO: 1; (vii) una secuencia que tenga al menos un 90 % de homología, preferentemente al menos un 95 % de homología, y aún más preferentemente al menos un 99 % de homología con la secuencia definida en cualquiera de (i), (ii), (iii), (iv), (v) o (vi). En otro modo de realización preferente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, en el que dicha molécula de ácido nucleico tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos y es complementaria de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida (GAA), y en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido y puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida, y en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una o más de las secuencias seleccionadas de (i) la secuencia definida por la posición [+3;+17] de SEQ ID NO: 1; (ii) la secuencia definida por la posición [+7;+21] de SEQ ID NO: 1; (iii) la secuencia definida por la posición [+17;+31] de SEQ ID NO: 1; (iv) una secuencia que tenga al menos un 90 % de homología, preferentemente al menos un 95 % de homología, y, aún más preferentemente, al menos un 99 % de homología con la secuencia definida en (i), (ii) o (iii). De nuevo en otro modo de realización preferente, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico, en el que dicha molécula de ácido nucleico tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos y es complementaria de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida (GAA), y en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido y puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida, y en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una o más de las secuencias seleccionadas de (i) la secuencia definida por la posición [+3;+17] de SEQ ID NO: 1; (ii) la secuencia definida por la posición [+7;+21] de SEQ ID NO: 1; o (iii) la secuencia definida por la posición [+17;+31] de SEQ ID NO: 1.

En un modo de realización particular, el ácido nucleico de la invención comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

En otro modo de realización preferente de la presente invención, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una o más de las secuencias seleccionadas de (i) la secuencia de SEQ ID NO: 2; (ii) la secuencia de SEQ ID NO: 3; (iii) la secuencia de SEQ ID NO: 4; (iv) la secuencia de SEQ ID NO: 5; (v) la secuencia de SEQ ID NO: 12; o (vi) la secuencia de SEQ ID NO: 13.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA) que presenta la mutación c.-32-13T>G, en el que la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es complementario de una secuencia de nucleótidos de dicho preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos de dicho preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que, preferentemente, dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 100 nucleótidos, preferentemente de 10 a 50 nucleótidos, aún más preferentemente una longitud de 10 a 35 nucleótidos, de nuevo aún más preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, aún más preferentemente, dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1).

La presente invención también se refiere al ácido nucleico como se define anteriormente, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la enfermedad de Pompe. Los pacientes tratados son aquellos cuyo genoma comprende una mutación que impide la inclusión del exón 2 del preARNm de la GAA dentro del ARNm maduro de la GAA. En particular, el paciente porta la mutación c.-32 IVS1-13 T>G o una mutación IVS1.-3 C>N (en la que N puede ser A, T o G, en particular A o G) en el intrón 1 del gen que codifica GAA. Muy preferentemente, el paciente porta la mutación c.-32-13 T>G en el intrón 1 del gen que codifica GAA. Típicamente y muy preferente, el paciente es un paciente humano y dicho paciente humano alberga al menos una copia de la mutación c.-32-13 T>G en el gen GAA. Por tanto, en otro aspecto, la presente invención proporciona la molécula de ácido nucleico según la invención, como se define en el presente documento, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la enfermedad de Pompe en un paciente, en el que dicho paciente es un paciente humano y dicho paciente humano alberga al menos una copia de la mutación c.-32-13 T>G en el gen GAA. Más preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende, o preferentemente consiste en, una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA. En un modo de realización muy preferente, la presente invención proporciona la molécula de ácido nucleico según la invención, como se define en el presente documento, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la enfermedad de Pompe en un paciente, en el que dicho paciente es un paciente humano y dicho paciente humano alberga al menos una copia de la mutación c.-32-13 T>G en el gen GAA, en el que, preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende, o preferentemente consiste en, una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA, y en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido.

En un modo de realización muy preferente, el ácido nucleico de la invención comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17.

La invención se refiere además a un procedimiento para tratar la enfermedad de Pompe causada por la no inclusión del exón 2, en particular la enfermedad de Pompe causada por la mutación c.-32 IVS1-13 T>G en el gen GAA, en un paciente que lo necesite, que comprende la etapa de administrar a dicho paciente un ácido nucleico como se define anteriormente. El ácido nucleico mejora la inclusión de dicho exón 2 durante el ayuste.

- 5 La presente invención también se refiere a un procedimiento para corregir la enfermedad de Pompe causada por una mutación que evita la inclusión del exón 2 del preARNm de la GAA dentro del ARNm maduro de la GAA, en particular la mutación c.-32 IVS1-13 T>G, usando la administración *in vivo* de cualquiera de los vectores génicos que codifican ARNnp genomanipulados, tales como ARNnp U1 o U7, que albergan las secuencias antisentido proporcionadas en el presente documento, o células miógenas autólogas genomanipuladas, con dichos ARNnp optimizados, tales como mesangioblastos, células AC 133+ o cualquier célula madre mesenquimal para la corrección de la disfunción del almacenamiento del glucógeno.

La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico de la invención.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 15 A lo largo de la memoria descriptiva, se emplean y se definen varios términos en los párrafos siguientes, así como en toda la memoria descriptiva.

Los términos "ayuste" e "inclusión de exón" son conocidos por el experto en la materia, y se usan en el presente documento en consecuencia. El término "ayuste", como se usa en el presente documento, se refiere a la modificación de un preARNm después de la transcripción, en la cual se eliminan intrones y se unen exones. El término "inclusión de exón", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso que da lugar a la inclusión en el ARNm completamente procesado de un exón que, de otro modo, se habría dejado fuera del ARNm maduro debido a un defecto de ayuste.

El término "oligonucleótido antisentido" se refiere a una sola cadena de ADN o ARN que es complementaria de una secuencia elegida. Un oligonucleótido antisentido puede hibridar con un preARNm o un ARNm que tenga una secuencia de nucleótidos codificante o no codificante complementaria.

- 25 El término "complementario", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que puede formar puente(s) de hidrógeno con otra secuencia de ácidos nucleicos ya sea mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick tradicional u otros tipos de emparejamiento no tradicionales (por ejemplo, puentes de hidrógeno de Hoogsteen o de Hoogsteen invertidos) entre nucleósidos o nucleótidos complementarios.

- 30 En referencia a las moléculas de ácido nucleico de la presente invención, y en particular en referencia a las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que son oligonucleótidos antisentido, la energía libre de unión de una molécula de ácido nucleico según la invención con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que la función pertinente de la molécula de ácido nucleico según la invención proceda y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión inespecífica de la molécula de ácido nucleico según la invención a secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de tratamiento terapéutico *ex vivo* o *in vivo*. La determinación de las energías libres de unión de las moléculas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Turner *et al.*, CSH Symp Quant Biol, 1987, LI: 123-133; Freier *et al.*, Proc Nat Acad Sci USA 1986, 83:9373-9377; y Turner *et al.*, J Am Chem Soc, 1987, 109:3783-3785). Por tanto, "complementario", como se usa en el presente documento, indica un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de modo que se produzca una unión estable y específica entre la molécula de ácido nucleico según la invención y la secuencia de nucleótidos diana del preARNm.

- Se entiende en la técnica que una molécula de ácido nucleico no necesita ser complementaria al 100 % de una secuencia de ácido nucleico diana para ser complementaria. Es decir, dos o más moléculas de ácido nucleico pueden ser menos que completamente complementarias. La complementariedad se indica mediante un porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar puentes de hidrógeno con una segunda molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, si una primera molécula de ácido nucleico tiene 10 nucleótidos y una segunda molécula de ácido nucleico tiene 10 nucleótidos, entonces el emparejamiento de bases de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos entre la primera y la segunda molécula de ácido nucleico representa un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 % y un 100 % de complementariedad, respectivamente. Moléculas de ácido nucleico "completamente" complementarias significa aquellas en las que todos los residuos contiguos de una primera molécula de ácido nucleico se unirán por puentes de hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos en una segunda molécula de ácido nucleico, en el que las moléculas de ácido nucleico tienen ambas el mismo número de nucleótidos (es decir, tienen la misma longitud) o las dos moléculas tienen diferentes longitudes. Un experto en la técnica reconocería que la molécula de ácido nucleico según la invención proporcionada en el presente documento es al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, aún más preferentemente al menos un 90 %, de nuevo aún más preferentemente al menos un 93 %, de nuevo aún más preferentemente al menos un 96 %, de nuevo aún más preferentemente al menos un 98% y, lo más preferentemente, un 100 % complementaria de la secuencia de nucleótidos diana del preARNm.

Por tanto, la molécula de ácido nucleico según la invención y la secuencia de nucleótidos diana del preARNm son complementarias entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleobases que se pueden unir entre sí para permitir una asociación estable entre la molécula de ácido nucleico según la invención y la secuencia de nucleótidos diana del preARNm como se indicó anteriormente.

5 Un experto en la técnica reconoce que es posible la inclusión de emparejamientos erróneos sin eliminar la capacidad de los compuestos oligoméricos de permanecer en asociación. Por lo tanto, en el presente documento se describen moléculas de ácido nucleico según la invención, que preferentemente son oligonucleótidos antisentido, que pueden comprender hasta aproximadamente un 20 % de nucleótidos que están emparejados erróneamente (es decir, no son nucleobases complementarias de los nucleótidos correspondientes de la diana). Preferentemente, las moléculas de ácido nucleico según la invención, que preferentemente son oligonucleótidos antisentido, contienen no más de 10 aproximadamente un 15 %, más preferentemente no más de aproximadamente un 10 %, lo más preferentemente no más de un 5 % o ningún emparejamiento erróneo.

15 El término "alfa-glucosidasa ácida" (también llamado: alfa-glucosidasa lisosomal o  $\alpha$ -1,4-glucosidasa) tiene su significado general en la técnica y se refiere a una proteína (por ejemplo, una enzima) que en los humanos está codificada por el gen GAA. Los errores en este gen causan la enfermedad del almacenamiento del glucógeno de tipo II (enfermedad de Pompe). La enzima GAA es esencial para la degradación del glucógeno en glucosa en los lisosomas.

Los términos "c.-32 IVS1-13 T>G" y "c.-32-13 T>G" se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a la misma mutación en el gen GAA (den Dunnen JT, *et al.*; Hum Genet. 2001; 109:121-124).

20 En el contexto de la invención, el término "paciente" se refiere a cualquier sujeto, afectado por la enfermedad de Pompe y que alberga al menos una copia del gen GAA que comprende una mutación que impide la inclusión del exón 2 en el ARNm. En particular, el paciente alberga al menos una copia de la mutación c.-32 IVS1-13 T>G o de una mutación IVS1.-3 C>N (en la que N puede ser A, T o G, en particular A o G) en el gen GAA. Más preferente, el paciente alberga al menos una copia de la mutación c.-32-13 T>G en el gen GAA. Típicamente y muy preferente, el paciente es un paciente humano y dicho paciente humano alberga al menos una copia de la mutación c.-32-13 T>G en el gen GAA.

En su sentido más amplio, el término "tratar" o "tratamiento" se refiere a revertir, aliviar, inhibir el progreso de o evitar el trastorno o afección al que se aplica dicho término, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección.

30 "Farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u desfavorable de otro modo cuando se administran a un mamífero, especialmente a un humano, según corresponda. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo, sólido, semisólido o líquido atóxico.

35 Los autores de la invención muestran en el presente documento que se pueden usar estrategias de modulación de ajuste para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Pompe. En particular, es posible tratar a un subconjunto significativo de pacientes con enfermedad de Pompe, en particular aquellos que albergan al menos una copia de la mutación c.-32 IVS1-13 T>G, gracias a la presente invención. Los autores de la invención demuestran un restablecimiento eficaz de la GAA sin precedentes en células de pacientes tratados *ex vivo* con oligómeros antisentido que se dirigen a dominios clave del preARNm de la GAA para rescatar la inclusión del exón 2 en el ARNm maduro.

40 Los expertos en la técnica reconocerán que existen muchas formas de determinar o medir el nivel de funcionalidad de una proteína, y de determinar el nivel de aumento o disminución de la funcionalidad, por ejemplo, en respuesta a un protocolo de tratamiento. Dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, medir o detectar una actividad de la proteína, etc. Dichas mediciones se realizan, en general, en comparación con una muestra de patrón o de control o "normal". Además, cuando la falta de una proteína interviene en el proceso de una enfermedad, los síntomas de la enfermedad se pueden monitorizar y/o medir para detectar indirectamente la presencia o ausencia de una proteína que funcione correctamente, o para evaluar el éxito de un protocolo de tratamiento que pretende remediar la falta de la proteína. En particular, el rescate de GAA en células de pacientes con enfermedad de Pompe (por ejemplo, la mutación c.-32 IVS1-13 T>G o una mutación IVS1.-3 C>N) se puede medir por varios procedimientos reconocidos. Por ejemplo, usando RT-PCR para evaluar la presencia del ARNm de la GAA de longitud completa (es decir, incluyendo el exón 2), o sometiendo a prueba la actividad de GAA midiendo los niveles de los depósitos de glucógeno en las células.

55 Como entenderán los expertos en la técnica, en el núcleo celular, los genes eucariotas se transcriben en ARN mensajeros precursores (preARNm), que contienen tanto exones como intrones. Para formar el ARNm maduro, el ajuste se produce en secuencias específicas en los bordes de los exones e intrones (sitios de ajuste), retirando de este modo los intrones y conectando los exones entre sí para formar el ARNm, que se traduce en proteínas. Durante los últimos veinte años, se han desarrollado enfoques de modulación de ajuste para interferir en dichos mecanismos. En particular, se ha informado de la inclusión satisfactoria del exón 7 del gen SMN2 usando oligonucleótidos antisentido que enmascaran un silenciador de ajuste intrínico (ISS) que abarca desde el nucleótido

10 al 25 en el intrón 7. Sin embargo, no hay información disponible en la técnica anterior que indique que se podría obtener la inclusión del exón 2 en el ARN de la GAA dirigiéndose a las secuencias de ESS en dicho exón 2.

En la presente invención, la proteína que se estabiliza o se restablece para que funcione es la alfa-glucosidasa ácida (GAA). Más específicamente, las secuencias codificadas por exones se incluyen a la fuerza usando un oligonucleótido antisentido (AON). En este caso, un AON está diseñado para complementar secuencias adecuadas, en particular secuencias de ARN dentro de la molécula de preARNm, que reducen el ajuste correcto del(de los) exón(ones) dirigido(s), bloqueando de este modo las secuencias que pueden albergar elementos de CIS negativos, tales como silenciadores de ajuste intrónicos (ISS) o silenciadores de ajuste exónicos (ESS), que excluirían los exones dirigidos al ARNm maduro.

En la presente invención, las secuencias de AON se seleccionan de manera que sean específicas, es decir, los AON son complementarios solo de las secuencias del preARNm dirigido y no de otras secuencias de ácido nucleico. Los AON usados en la práctica de la invención pueden ser de cualquier tipo adecuado, por ejemplo, oligodesoxirribonucleótidos, oligorribonucleótidos, morfolinos, nucleótidos antisentido de triciclo-ADN, triciclo-ADN fosforotioato, LNA, AON modificados en U7 o U1 o productos conjugados de los mismos, tales como AON conjugados con péptidos o complejados con nanopartículas, que son conocidos por los expertos en la técnica (Bell, NM, *et al.*, ChemBioChem, 2009, 10:2691-2703 y referencias citadas en el mismo). Los AON empleados en la práctica de la invención tienen, en general, una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 35 nucleótidos, en particular de aproximadamente 13 a aproximadamente 35 nucleótidos o de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos, y pueden tener una longitud de, por ejemplo, aproximadamente 10, o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 30 nucleótidos o más. Típicamente, los AON de morfolino tienen una longitud de aproximadamente 25-30 nucleótidos, los AON de 2'PMO tienen una longitud de aproximadamente 20-25 nucleótidos, y los triciclo-AON tienen una longitud de aproximadamente 13-20 nucleótidos, los AON modificados en U7 y U1 posiblemente pueden llevar secuencias antisentido más largas de aproximadamente 50 nucleótidos.

En particular, el objetivo de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico como se describe en el presente documento, unida a un ARN nuclear pequeño (ARNnp) de U7 o U1 modificado. La información sobre la modificación de U7 se puede encontrar en particular en Goyenvalle A, *et al.*, Science 2004, 306:1796-1799; Goyenvalle A, *et al.*, Mol Ther, 2009 7:1234-1240; Denti MA, *et al.*, Hum Gene Ther, 2006 17(5):565-574; Geddicke-Hornung C, *et al.*, EMBO Mol Med, 2013 5(7):1060-1077; Hoogaars WM, *et al.*, Hum Gene Ther, 2012 23(12):1269-1279; Vulin A, *et al.*, Mol Ther, 2012 20(11):2120-2133; Goyenvalle A, *et al.*, Hum Mol Genet, 2012 21(11):2559-2571; Goyenvalle A, *et al.*, Mol Ther, 2012 20(6):1212-1221, François V, *et al.*, Nat Struct Mol Biol, 2011 18(1):85-87; Quenneville SP, *et al.*, Mol Ther, 2007 15(2):431-438; el documento WO11113889; el documento WO06021724; y referencias citadas en los mismos. Las diversas modificaciones del ARNnp de U1 o U7, preferentemente de U7, útiles para la presente invención son conocidas por los expertos en la técnica y, a modo de ejemplo, algunas de ellas están ejemplificadas en la literatura dada.

El ARNnp de U7 normalmente interviene en el procesamiento del extremo 3' del preARNm de la histona, pero se puede convertir en una herramienta versátil para la modulación del ajuste mediante un pequeño cambio en el sitio de unión de las proteínas Sm/Lsm. La secuencia antisentido incrustada en una partícula de RNPnp está, por lo tanto, protegida de la degradación y se acumula en el núcleo donde se produce el ajuste.

Los términos "ARNnp de Ux genomanipulado" o "ARNnp de Ux modificado", como se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a (i) la optimización del promotor que dirige la transcripción del ARNnp de Ux genomanipulado, en el que la optimización puede potenciar o reducir la actividad del promotor, típicamente y preferentemente potenciando la actividad del promotor; (ii) optimizar el dominio "sm" del ARNnp natural, en el que la optimización engloba, como se indica en el presente documento y en las referencias citadas, la localización subcelular apropiada donde se produce el ajuste; (iii) el dominio antisentido natural del ARNnp de Ux se reemplaza por la secuencia antisentido "a propósito", que, por tanto, puede hibridar el preARNm dirigido y, por tanto, por las moléculas de ácido nucleico preferentes de la presente invención.

Por tanto, en un modo de realización preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de Ux modificado, preferentemente a un ARNnp de U7 o U1 modificado, y además, preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7 modificado, y, de nuevo preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7SmOPT modificado, en el que la secuencia de SmOPT se proporciona en la fig. 7 y se refiere a la posición 30 a 40 de SEQ ID NO: 18.

Por tanto, en otro modo de realización preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico útil para tratar la enfermedad de Pompe, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, y en el que

dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7 o U1 modificado, y en el que, preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7 modificado.

De nuevo, en otro modo de realización preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico útil para tratar la enfermedad de Pompe, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, y en el que dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7 modificado, en el que, preferentemente, dicho ARNnp de U7 modificado es un ARNnp de U7SmOPT modificado, en el que la secuencia SmOPT se refiere a la posición 30 a 40 de SEQ ID NO: 18.

En otro modo de realización preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es complementario de una secuencia de nucleótidos de dicho preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos de dicho preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que, preferentemente, dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 13 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 10, o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 25 nucleótidos. El término "puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA)", como se usa y describe en detalle en el presente documento, se refiere al correcto ajuste del intrón 1 que permite la formación de un ARNm de la GAA completo, que se puede traducir en una proteína completamente funcional (el codón de iniciación ATG está en el exón 2: el exón 2 faltante hace que el delta2-ARNm no se pueda traducir en alfa-glucosidasa ácida humana).

En otro modo de realización preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA) que presenta la mutación c.-32-13T>G, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es complementario de una secuencia de nucleótidos de dicho preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos de dicho preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que, preferentemente, dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 13 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 10, o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 25 nucleótidos.

De nuevo, en otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana que presenta la mutación c.-32-13T>G, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, y en el que dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7 o U1 modificado, y en el que, preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7 modificado.

De nuevo, en otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana que presenta la mutación c.-32-13T>G, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, y en el que dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7 modificado, en el que, preferentemente, dicho ARNnp de U7 modificado es un ARNnp de U7SmOPT modificado, en el que la secuencia de SmOPT se refiere a la posición 30 a 40 de SEQ ID NO: 18.

Se divulga además un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. Preferentemente, dicho vector comprende una molécula de ácido nucleico que puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm

de la alfa-glucosidasa ácida humana que presenta la mutación c.-32-13T>G, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, y en el que dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7 modificado, en el que, preferentemente, dicho ARNnp de U7 modificado es un ARNnp de U7SmOPT modificado, en el que la secuencia de SmOPT se refiere a la posición 30 a 40 de SEQ ID NO: 18. Además, preferentemente, dicho vector se selecciona de plásmidos, vectores adenovíricos, vectores adenovíricos asociados y vectores lentivíricos, preferentemente de vectores adenovíricos, vectores adenovíricos asociados. Por tanto, en un modo de realización muy preferente, dicho vector es un vector adenovírico o un vector adenovírico asociado y comprende una molécula de ácido nucleico que puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana que presenta la mutación c.-32-13T>G, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 29 nucleótidos, y en el que dicha molécula de ácido nucleico se une a un ARNnp de U7 modificado, en el que dicho ARNnp de U7 modificado es un ARNnp de U7SmOPT modificado, en el que la secuencia de SmOPT se refiere a la posición 30 a 40 de SEQ ID NO: 18.

Además, se divulga una célula eucariota aislada transfectada por el vector divulgado, y en el que dicha célula es preferentemente una célula muscular estriada, un mioblasto o una célula que puede realizar una diferenciación muscular.

Se divulga además una composición farmacéutica que comprende el vector divulgado o la célula divulgada. Se divulga además el vector divulgado o la célula divulgada como un medicamento. Se divulga además el vector divulgado para tratar la enfermedad de Pompe.

Se divulga además la célula divulgada para tratar la enfermedad de Pompe. Se divulga además un procedimiento para restablecer la función de la alfa-glucosidasa ácida humana mediante la inclusión del exón 2 que comprende la etapa de poner en contacto una célula con el vector divulgado.

Un objetivo de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico complementaria de una secuencia de ácido nucleico 5' en el exón 2 de un gen GAA, pudiendo la molécula de ácido nucleico liberar el sitio aceptor del exón 2 de una horquilla fuerte formada cuando el gen GAA comprende una mutación puntual que da como resultado la exclusión del exón 2 del ARNm tal como la c.-32 IVS1-13 T>G o una mutación IVS1.-3C>N.

Otro objetivo de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico complementaria de una secuencia de ácido nucleico de un gen GAA, pudiendo esta molécula de ácido nucleico corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la GAA. La presente invención se refiere en particular a una molécula de ácido nucleico (o de otro modo denominada oligonucleótido antisentido en la presente solicitud) complementaria del exón 2 de un gen GAA, en particular de una región 5' del exón 2, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico una secuencia de nucleótidos complementaria de una o más secuencias de silenciadores exónicos (ESS) en el exón 2 del gen que codifica la alfa-glucosidasa ácida. Dicha molécula de ácido nucleico puede, por tanto, enmascarar las ESS en el exón 2 y, por lo tanto, promueve la inclusión de dicho exón en el ARNm que codifica la alfa-glucosidasa ácida. Las secuencias ESS reclutan inhibidores del ajuste en el preARNm. El enmascaramiento de estas secuencias puede, por tanto, disminuir este reclutamiento y promover la inclusión del exón 2 en el ARNm. Las ESS se pueden encontrar en una secuencia dada en busca de secuencias consenso. En particular, se puede usar la herramienta bioinformática Human Splicing Finder para identificar dichas ESS (Desmet *et al.*, 2009, Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals, *Nucleic Acids Research*, 2009, 1-14; [www.umd.be/HSF/](http://www.umd.be/HSF/)).

Los autores de la presente invención muestran que una molécula de ácido nucleico de la invención, que es una molécula dirigida a una o varias ESS en el exón 2, puede restablecer la inclusión de dicho exón 2 en el ARNm de pacientes portadores de una mutación del GAA que daría como resultado la exclusión de dicho exón 2 en ausencia de la molécula de ácido nucleico de la invención.

Por lo tanto, en un modo de realización de la presente invención, la molécula de ácido nucleico tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos, y es complementaria de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida, en el que dicho ácido nucleico puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida, y en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de la secuencia del silenciador exónico (ESS) en el exón 2 del gen que codifica la alfa-glucosidasa ácida.

La molécula de ácido nucleico de la invención comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones +3 +45 del exón 2 del gen GAA. En otro modo de

realización particular, la molécula de ácido nucleico de la invención comprende una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano. En un modo de realización particular, la molécula de ácido nucleico de la invención comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una o más de las secuencias definidas por las posiciones 3-17, 7-21 o 17-31 en SEQ ID NO: 1 o en una secuencia que tiene al menos un 90 % de homología con SEQ ID NO: 1, en particular al menos un 95 %, más particularmente al menos un 99 %. En otro modo de realización preferente de la presente invención, la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una o más de las secuencias seleccionadas de (i) la secuencia definida por la posición [+3;+17] de SEQ ID NO: 1; (ii) la secuencia definida por la posición [+7;+21] de SEQ ID NO: 1; (iii) la secuencia definida por la posición [+17;+31] de SEQ ID NO: 1; (iv) una secuencia que tiene al menos un 90 % de homología, preferentemente al menos un 99 % de homología con la secuencia definida en (i), (ii) o (iii).

En un modo de realización más particular, dicha molécula de ácido nucleico es complementaria de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13.

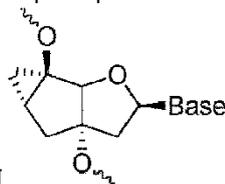
SEQ ID NO:2	5' - CUGUAGGAGCUGUCC - 3'
SEQ ID NO:3	5' - AGGAGCUGUCCAGGC - 3'
SEQ ID NO:4	5' - CAGGCCAUCUCCAAC - 3'
SEQ ID NO:5	5'- CUGUAGGAGCUGUCCAGGCCAUCUCCAACCAUGGGAGUGAGGCA - 3'
SEQ ID NO:12	5'- CUGUAGGAGCUGUCCAGGCCAUCUCCAAC - 3'
SEQ ID NO:13	5'- CUGUAGGAGCUGUCCAGGCCAUCUCCAACCAUGGGAGUGAGGC - 3'

Los oligonucleótidos antisentido (AON) de la invención se pueden sintetizar *de novo* usando cualquiera de una serie de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de b-cianoetil fosforamidita (Beaucage, S. L., and Caruthers, M. H., Tet. Let. 22:1859, 1981); el procedimiento del nucleósido H-fosfonato (Garegg *et al.*, Tet. Let. 27:4051-4054, 1986; Froehler *et al.*, Nucl. Acid. Res. 14:5399-5407, 1986; Garegg *et al.*, Tet. Let. 27:4055-4058, 1986, Gaffney *et al.*, Tet. Let. 29:2619-2622, 1988). Estas químicas se pueden realizar mediante una variedad de sintetizadores de ácidos nucleicos automatizados disponibles en el mercado. Estos ácidos nucleicos se pueden denominar ácidos nucleicos sintéticos. De forma alternativa, se pueden producir AON a gran escala en plásmidos, (véase Sambrook, T., *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, 1989). Se pueden preparar AON a partir de secuencias de ácidos nucleicos existentes usando técnicas conocidas, tales como las que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas. Los AON preparados de esta manera se pueden denominar ácidos nucleicos aislados.

Para su uso *in vivo*, los AON se pueden estabilizar. Un AON "estabilizado" se refiere a un AON que es relativamente resistente a la degradación *in vivo* (por ejemplo, por medio de una exonucleasa o endonucleasa). La estabilización puede ser una función de longitud o estructura secundaria. De forma alternativa, la estabilización de AON se puede lograr por medio de modificaciones de la cadena principal de fosfatos. Los AON estabilizados preferentes de la presente invención tienen una cadena principal modificada, por ejemplo, tienen enlaces fosforotioato para proporcionar actividad máxima y proteger al AON de la degradación por exonucleasas y endonucleasas intracelulares. Otras posibles modificaciones estabilizadoras incluyen modificaciones de fosfodiéster, combinaciones de modificaciones de fosfodiéster y fosforotioato, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato, *p*-etoxi y combinaciones de los mismos. Las versiones modificadas químicamente estabilizadas de los AON también incluyen "Morfolinos" (oligómeros de morfolino fosforodiamidato, PMO), oligómeros de 2'-O-Met, oligómeros de triciclo(tc)-ADN (documento WO2010/115993), oligómeros de triciclo(tc)-fosforotioato ADN, (documento WO2013/053928), LNA, etc., que son todos conocidos por los expertos en la técnica (Bell, NM, *et al.*, ChemBioChem, 2009, 10:2691-2703 y referencias citadas en el mismo).

El término "triciclo-ADN (tc-ADN)" se refiere a una clase de análogos de oligodesoxirribonucleótidos restringidos en los que cada nucleótido se modifica mediante la introducción de un anillo de ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional de la cadena principal y para optimizar la geometría de la cadena principal del ángulo de torsión  $\gamma$  (Ittig D, *et al.*, Nucleic Acids Res, 2004, 32:346-353; Ittig D, *et al.*, Prague, Academy of Sciences of the Czech Republic. 1:21-26 (Coll. Symp. Series, Hocec, M., 2005); Ivanova *et al.*, Oligonucleotides 2007, 17:54-65; Renneberg D, *et al.*, Nucleic Acids Res, 2002, 15 30:2751-2757; Renneberg D, *et al.*, Chembiochem, 2004, 5:1114-1118; y Renneberg D, *et al.*, JACS, 2002, 124:5993-6002). En detalle, el tc-ADN difiere estructuralmente del ADN por un puente de etileno adicional entre los centros C(3') y C(5') de los nucleósidos, a los que se fusiona una unidad

de ciclopropano para potenciar aún más la rigidez estructural como se muestra en la siguiente fórmula ("tc-



nucleósido"): ¶

Los términos "enlace fosforotioato" o "modificación de fosforotioato", como se usan de manera intercambiable en el presente documento, se refieren a un resto 5' ... -O-P(S)-O-... 3' entre dos nucleósidos adyacentes en una molécula de ácido nucleico.

Por lo tanto, el término "tricyclo-fosforotioato ADN (tc-PS-ADN)" se refiere a tc-ADN, en el que al menos dos nucleósidos tc adyacentes, preferentemente más de dos tc-nucleósidos adyacentes, y, lo más preferentemente, todos los tc-nucleósidos se une por enlaces fosforotioato internucleosídicos. Si están presentes otras modificaciones, incluyen modificaciones de fosfodiéster, metilfosfonato, metilfosforotioato, fosforoditioato y *p*-etoxi, y combinaciones de las mismas.

En otro modo de realización preferente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en oligonucleótidos antisentido de tricyclo-ADN, y en el que preferentemente dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico útil para tratar la enfermedad de Pompe que comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 35 nucleótidos, preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico útil para tratar la enfermedad de Pompe que comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 13 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 10, o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 25 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humano, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos, preferentemente de 10 a 35 nucleótidos, preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humano, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el

que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 35 nucleótidos, aún más preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana que presente la mutación c.-32-13T>G, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 35 nucleótidos, preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana que presente la mutación c.-32-13T>G, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 13 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 25 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

En otro modo de realización preferente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en oligonucleótidos antisentido de triciclo-fosforotioato ADN, y en el que preferentemente dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico útil para tratar la enfermedad de Pompe que comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-PS-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 35 nucleótidos, preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17. En otros modos de realización preferentes, todos los tc-nucleósidos de dicho tc-PS-ADN se une por enlaces fosforotioato internucleosídicos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico útil para tratar la enfermedad de Pompe que comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-PS-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 13 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 10, o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 25 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido

nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17. En otros modos de realización preferentes, todos los tc-nucleósidos de dicho tc-PS-ADN se une por enlaces fosforotioato internucleosídicos.

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humano, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-PS-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha  
10 secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 50 nucleótidos, preferentemente de 10 a 35 nucleótidos, preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido  
15 nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17. En otros modos de realización preferentes, todos los tc-nucleósidos de dicho tc-PS-ADN se une por enlaces fosforotioato internucleosídicos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humano, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o  
20 consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho oligonucleótido antisentido es un tc-PS-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID  
25 NO: 1) tiene una longitud de 10 a 35 nucleótidos, aún más preferentemente de 13 a 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17. En  
30 otros modos de realización preferentes, todos los tc-nucleósidos de dicho tc-PS-ADN se une por enlaces fosforotioato internucleosídicos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana que presente la mutación c.-32-13T>G, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho  
35 oligonucleótido antisentido es un tc-PS-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de 10 a 35 nucleótidos, preferentemente de 13 a  
40 35 nucleótidos o de 10 a 30 nucleótidos, y tiene, por ejemplo, una longitud de 10, o 15, o 20 o 30 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17. En otros modos de realización preferentes, todos los tc-nucleósidos de dicho tc-PS-ADN se une  
45 por enlaces fosforotioato internucleosídicos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que puede restablecer el ajuste normal del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana que presente la mutación c.-32-13T>G, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en un oligonucleótido antisentido, en el que dicho  
50 oligonucleótido antisentido es un tc-PS-ADN y es complementario de una secuencia de nucleótidos del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana (GAA), en el que dicha secuencia de nucleótidos del preARNm de la GAA es una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1), y en el que preferentemente dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 13 hasta aproximadamente 29 nucleótidos, y tiene, por  
55 ejemplo, una longitud de 10, o aproximadamente 15, o aproximadamente 20 o aproximadamente 25 nucleótidos, y en el que, además, preferentemente dichos nucleótidos son nucleótidos contiguos en dicha región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen GAA humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17. En otros modos de realización preferentes, todos los tc-nucleósidos de dicho tc-PS-ADN se une  
60 por enlaces fosforotioato internucleosídicos.

En un modo de realización muy preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 14.



oligonucleótido antisentido, y en el que dicho oligonucleótido antisentido es un 2'-O-metil-fosforotioato oligorribonucleótido.

De nuevo, en otro modo de realización muy preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que todas las timinas (t) de dicha SEQ ID NO: 16 están sustituidas por uracilos (u), en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, y en el que dicho oligonucleótido antisentido es un 2'-O-metil-oligorribonucleótido. Por tanto, preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que todas las timinas (t) de dicha SEQ ID NO: 16 están sustituidas por uracilos (u), en el que dicha molécula de ácido nucleico es un 2'-O-metil-ARN con oligonucleótidos antisentido de la cadena principal de fosforotioato completa (2'-O-Met). Por tanto, de nuevo, en otro modo de realización muy preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 16, en el que todas las timinas (t) de dicha SEQ ID NO: 16 están sustituidas por uracilos (u), en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, y en el que dicho oligonucleótido antisentido es un 2'-O-metil-fosforotioato oligorribonucleótido.

En otro modo de realización muy preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 17, en el que todas las timinas (t) de dicha SEQ ID NO: 17 están sustituidas por uracilos (u), en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, y en el que dicho oligonucleótido antisentido es un 2'-O-metil-oligorribonucleótido. Por tanto, preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 17, en el que todas las timinas (t) de dicha SEQ ID NO: 17 están sustituidas por uracilos (u), en el que dicha molécula de ácido nucleico es un 2'-O-metil-ARN con oligonucleótidos antisentido de la cadena principal de fosforotioato completa (2'-O-Met). Por tanto, en otro modo de realización muy preferente de la presente invención, dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia como se expone en SEQ ID NO: 17, en el que todas las timinas (t) de dicha SEQ ID NO: 17 están sustituidas por uracilos (u), en el que dicha molécula de ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido, y en el que dicho oligonucleótido antisentido es un 2'-O-metil-fosforotioato oligorribonucleótido.

Los términos "oligómero de morfolino" o "PMO" (oligómero de morfolino fosforamidato o fosfordiamidato) son conocidos por los expertos en la técnica y se han descrito en detalle (Singh Y, *et al.* 2010, Chem Soc Rev 39:2054-2070 así como en las patentes de EE. UU. n.º 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063, 5.506.337, 8.076.476, 8.299.206 y 7.943.762).

Otras formas de AON que se pueden usar para este efecto son secuencias de AON unidas a moléculas de ARN nuclear pequeño tales como U1 o U7 en combinación con un procedimiento de transferencia vírica basado en, pero no limitado a, lentivirus o virus adenoasociados (Denti, MA, *et al.*, Hum Gene Ther, 2008 19(6):601-608; Goyenvalle, A, *et al.*, Science 2004 306:1796-1799; documento WO11113889; documento WO06021724).

La invención también se refiere a una composición que comprende una molécula de ácido nucleico (o AON) de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Además de AON, las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden incluir un vehículo farmacéutica o fisiológicamente aceptable tal como solución salina, fosfato de sodio, etc. Las composiciones estarán, en general, en forma de un líquido, aunque esto no siempre tenga que ser así. Los vehículos, excipientes y diluyentes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfatos de calcio, alginato, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, jarabe de agua, metilcelulosa, metil y propilhidroxibenzoatos, aceite vegetal, etc. Las formulaciones también pueden incluir agentes lubricantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, conservantes, agentes tamponantes, etc. En particular, la presente invención implica la administración de AON y, por tanto, es algo semejante al tratamiento génico. Los expertos en la técnica reconocerán que los ácidos nucleicos se administran a menudo junto con lípidos (por ejemplo, lípidos catiónicos o lípidos neutros, o mezclas de estos), con frecuencia en forma de liposomas u otro material microestructurado o nanoestructurado adecuado (por ejemplo, micelas, lipocomplejos, dendrímeros, emulsiones, fases cúbicas, etc.).

Las composiciones de la invención se administran, en general, mediante inyección, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, aunque no se excluyen otros tipos de administración, por ejemplo, inhalación, tópica, oral, etc. Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles, se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispensadores o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente parenteralmente aceptable atóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Si bien la administración puede ser local (es decir, *in situ*, directamente en tejido, tal como tejido muscular) o sistémica, normalmente la administración será local al tejido muscular afectado, por ejemplo, al músculo estriado, músculo liso, músculo cardíaco, etc. Dependiendo de la forma de los AON que se administren y el tipo de tejido o célula al que se dirigen, se pueden emplear técnicas tales como electroporación, sonoporación, un "cañón de genes" (que administra partículas de oro recubiertas de ácido nucleico), etc.

Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad de un AON que se va a administrar será una cantidad que sea suficiente para inducir una mejoría de los síntomas de una enfermedad no deseados. Dicha cantidad puede variar,

entre otras cosas, dependiendo de factores tales como el sexo, la edad, el peso, el estado físico general, del paciente, etc., y se puede determinar caso por caso. La cantidad también puede variar de acuerdo con los otros componentes de un protocolo de tratamiento (por ejemplo, la administración de otros medicamentos tales como esteroides, etc.). En general, una dosis adecuada está en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, y más generalmente de aproximadamente 2 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. Si se elige una administración de AON basada en virus, las dosis adecuadas dependerán de diferentes factores, tales como la cepa vírica que se emplea, la vía de administración (intramuscular, intravenosa, intraarterial u otra), pero típicamente puede variar de  $10^{10}$  a  $10^{12}$  partículas víricas/kg. Los expertos en la técnica reconocerán que dichos parámetros se calculan normalmente durante los ensayos clínicos. Además, los expertos en la técnica reconocerán que, aunque los síntomas de enfermedad se pueden aliviar completamente con los tratamientos descritos en el presente documento, esto no tiene que ser así. Incluso un alivio parcial o intermitente de los síntomas puede ser de gran beneficio para el receptor. Además, el tratamiento del paciente no es normalmente un acontecimiento único. Más bien, los AON de la invención probablemente se administrarán en múltiples ocasiones, que pueden ser, dependiendo de los resultados obtenidos, con varios días de diferencia, con varias semanas de diferencia o con varios meses de diferencia, o incluso con varios años de diferencia.

Con referencia al tratamiento de los pacientes con la enfermedad de Pompe con la mutación c.-32 IVS1-13 T>G, los procedimientos de la presente invención se pueden implementar de varias maneras diferentes. Por ejemplo, los AON de la presente invención se pueden administrar conjuntamente con AON diseñados para retirar/incluir otros exones de otros genes (por ejemplo, en una sola mezcla, o en mezclas separadas pero administradas en una estrecha proximidad temporal, tal como una inmediatamente después de la otra - en cualquier orden - con solo unos minutos u horas entre administraciones). De forma alternativa, a un paciente que ya está en tratamiento usando, por ejemplo, tratamiento génico o tratamiento de restitución de enzimas o tratamiento con chaperonas se le puede tratar mediante los procedimientos de la invención. En otras palabras, los AON de la invención se pueden administrar a un paciente que ya está recibiendo o ha estado recibiendo otro tratamiento, pero que todavía necesita una mejoría adicional de las capacidades funcionales de las moléculas de GAA producidas como resultado del otro tratamiento.

Si los AON de la presente invención se van a administrar con AON diseñados para propósitos que no sean mejorar la inclusión del exón 2 del ARNm de la GAA, una posible ruta de administración es incluir secuencias que codifiquen ambos tipos de AON (aquellos diseñados para incorporar el exón 2 del preARNm de la GAA y aquellos diseñados por otra razón) en un único vector que se administra a un paciente. Los expertos en la técnica reconocerán que hay varios vectores disponibles para su uso en la administración de secuencias de ácido nucleico, de modo que las secuencias de ácido nucleico se pueden transcribir *in vivo* dentro del receptor. Los ejemplos de dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, diversos vectores derivados de virus atenuados, tales como vectores retrovíricos, vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados, vectores del VIH y del virus de la gripe, etc. También se podrían emplear vectores basados en bacterias atenuadas, por ejemplo, vectores basados en micobacterias. Los expertos en la técnica reconocerán que, si se usan estos tipos de procedimientos, puede ser preferente evitar administraciones múltiples que podrían dar como resultado una respuesta inmunitaria adversa al vector.

Los individuos o pacientes tratados mediante los procedimientos descritos en el presente documento son típicamente mamíferos, normalmente humanos. Sin embargo, esto no siempre tiene que ser así. También se contemplan aplicaciones veterinarias de esta tecnología.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar más la invención, pero no deben interpretarse para limitar la invención de ninguna manera.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es un gel de agarosa que muestra la falta de exón 2 en los ARNm de la GAA de células con c.-32 IVS1-13 T>G. La presencia del exón 2 se evaluó mediante RT-PCR con cebadores internos (PCR1 del exón 1 al exón 3, seguida de PCR2 del exón 2 al exón 3) usando muestras de ARN extraídas de fibroblastos primarios de un paciente con la c.-32 IVS1-13 T>G (carril 1) o fibroblastos de un individuo sano (carril 2). El amplicón de 670 pares de bases que da fe de la inclusión del exón 2 en el ARNm de la GAA final no se detectó en el extracto de ARN de las células con c.-32-13T>G.

La figura 2 es una representación esquemática del complejo de ayustosoma.

La figura 3 es una representación esquemática de los motivos de ajuste implicados en la definición del exón 2 del preARNm de la GAA y las consecuencias en presencia de la mutación c.-32 IVS1-13 T>G.

La figura 4 representa las secuencias diana antisentido para desenrollar el sitio aceptor del exón 2 en los preARNm de c.-32 IVS1-13 T>G.

La figura 5A es un gel de agarosa que muestra la inclusión del exón 2 en los ARNm de la GAA de células con la mutación c.-32-13T>G, después de la transfección con oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN de acuerdo con la presente invención. La presencia del exón 2 se evaluó mediante RT-PCR con cebadores internos (PCR1 del exón 1 al exón 4, seguida de PCR2 dentro del exón 2 que dio lugar a un amplicón de 545 pares de bases). El carril 1 es un control negativo donde el extracto de ARN se sustituye por H<sub>2</sub>O. El carril 2 es células con C-32-13T>G no

tratadas. El carril 3 es células sanas. Los carriles 4, 5 y 6 son células con c.-32-13T>G transfectadas con AON1 (tc-PS-ADN) que tienen la SEQ ID NO: 14 (y que hibridan con SEQ ID NO: 2), AON2 (tc-PS-ADN) que tiene SEQ ID NO: 15 (y que hibrida con SEQ ID NO: 3) y AON3 (tc-PS-ADN) que tiene SEQ ID NO: 16 (y que hibrida con SEQ ID NO: 4), respectivamente.

5 La figura 5B es un análisis mediante inmunoelectrotransferencia de la expresión de la proteína GAA después de la transfección con oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN de acuerdo con la presente invención. El carril 1 es células sanas. El carril 2 es células con C-32-13T>G no tratadas. Los carriles 3, 4 y 5 son células con c.-32-13T>G transfectadas con AON1 (tc-PS-ADN) que tienen la SEQ ID NO: 14 (y que hibridan con SEQ ID NO: 2), AON2 (tc-PS-ADN) que tiene SEQ ID NO: 15 (y que hibrida con SEQ ID NO: 3) y AON3 (tc-PS-ADN) que tiene SEQ ID NO: 16 (y que hibrida con SEQ ID NO: 4), respectivamente. La alfa-glucosidasa alfa se revela como una proteína de aproximadamente 70 kDa en los carriles 1, 3, 4 y 5.

15 La figura 6 es un gel de agarosa que muestra la inclusión del exón 2 en los ARNm de la GAA en células con la mutación c.-32-13T>G, después de la transfección con 2'-O-metil-ARN con oligonucleótidos antisentido de cadena principal de fosforotioato completa (2'-O-Met) de acuerdo con la presente invención. La presencia del exón 2 se evaluó mediante RT-PCR con cebadores internos (PCR1 del exón 1 al exón 3, seguida de PCR2 del exón 2 al exón 3, lo que dio lugar a un amplicón de 670 pares de bases que da fe de la inclusión del exón 2 en el ARNm de la GAA). El carril 1 es células con C-32-13T>G no tratadas. Los carriles 2, 3 y 4 son células con c.-32-13T>G transfectadas con AON1 (2'-O-Met) que tienen la SEQ ID NO: 14 (y que hibridan con SEQ ID NO: 2), AON2 (2'-O-Met) que tiene SEQ ID NO: 15 (y que hibrida con SEQ ID NO: 3) y AON3 (2'-O-Met) que tiene SEQ ID NO: 16 (y que hibrida con SEQ ID NO: 4), respectivamente.

20 La figura 7 es una representación esquemática del ARNnp de U7opt que alberga una secuencia antisentido que se dirige a la secuencia del exón 2 que abarca desde el nucleótido 3 al nucleótido 31 (U7opt-AS [+3;+31]). Este ARNnp de U7opt con el oligonucleótido antisentido también se muestra en la SEQ ID NO: 6 (excluyendo SmOPT) y SEQ ID NO: 18 (inyendo SmOPT como se muestra en la figura 7 y denominada U7opt-AS[+3;+31]).

25 La figura 8A es un gel de agarosa que muestra la inclusión del exón 2 en los ARNm de la GAA en células con la mutación c.-32-13T>G, después de la transducción con un lentivector (LV) que codifica U7opt-AS[+3;+31] de SEQ ID NO: 18). La presencia del exón 2 se evaluó mediante RT-PCR (del exón 1 al exón 3), lo que dio lugar a un amplicón de 635 pares de bases que da fe de la inclusión del exón 2 en el ARNm de la GAA. El carril 1 es células sanas. El carril 2 es células con C-32-13T>G no tratadas. Los carriles 3, 4 y 5 son células con c.-32-13T>G (25 × 10<sup>3</sup> células) suministradas con 10 µl, 5 µl o 1 µl de LV (U7opt-AS[+3;+31]), respectivamente.

30 La figura 8B es un análisis mediante inmunoelectrotransferencia de la expresión de la proteína GAA después de la transducción con LV (U7opt-AS[+3;+31]) de acuerdo con la presente invención. El carril 1 es células sanas. El carril 2 es células con C-32-13T>G no tratadas. El carril 3 es de células con c.-32-13T>G (25 × 10<sup>3</sup> células) suministradas con 1 µl de LV(U7opt-AS[+3;+31]). La alfa-glucosidasa alfa se revela como una proteína de aproximadamente 70 kDa en los carriles 1 y 3.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

35 La enfermedad de Pompe (también llamada GSD II - enfermedad del almacenamiento del glucógeno II) es un trastorno recesivo hereditario causado por mutaciones en el gen GAA que codifica la enzima alfa-glucosidasa ácida (también llamada alfa-glucosidasa lisosomal o α-1,4-glucosidasa), que da lugar a una acumulación de glucógeno lisosomal masiva y a debilidad muscular progresiva que afecta a las extremidades proximales y los músculos respiratorios. La enfermedad engloba un amplio espectro de fenotipos clínicos, que difieren en términos de edad de aparición, grado de afectación de los órganos y tasa de progresión: Las formas en lactantes (incidencia: 1/140 000) normalmente se correlacionan con una evolución de la enfermedad más activa y la mayoría de los pacientes mueren a la edad de un año; las formas en niños y adultos (incidencia: 1/60 000) son más variables entre los pacientes; siempre dan como resultado pérdida de deambulación, respiración asistida y mortalidad prematura.

40 Se han identificado cientos de mutaciones de GAA, pero algunas son más comunes entre grupos étnicos dados. Entre ellas, la mutación c.-32 IVS1-13 T>G se encuentra en más de la mitad de todos los pacientes adultos de raza blanca. Es una mutación de ajuste que reduce espectacularmente la inclusión normal del segundo exón del gen GAA. El resultado más importante de este ajuste erróneo es que los ARNm de Δ2-GAA consiguientes (más de un 90 % de los transcritos de GAA resultantes del gen mutado) carecen de su codón de iniciación y, por lo tanto, no se pueden traducir en proteínas semifuncionales (Fig. 1).

45 Las mutaciones de ajuste son muchas y variadas. Las más graves (por ejemplo, que desactivan totalmente las reacciones de ajuste) son aquellas que afectan típicamente a los sitios de donante (GU) o aceptor (AG) de consenso en los extremos 5' y 3' de los intrones, alterando de este modo las reacciones de transesterificación. Las mutaciones que afectan a los elementos reguladores que actúan en cis (silenciadores o potenciadores) y otros rasgos característicos del ARN que influyen en el ajuste son normalmente menos graves, dado que la inhibición resultante a menudo es incompleta y todavía se pueden sintetizar algunos transcritos normales. La transición de T a

G provocada por la mutación c.-32 IVS1-13 es una de esas. Se sitúa dentro del tracto de pirimidinas (también llamado polipirimidina - Py), una serie de pirimidinas (y) entre el sitio de ramificación (en humanos, el consenso de ramificación es yUnAy) y el AG en el extremo 3' del intrón, que permite la reclutamiento de la proteína del factor auxiliar de U2 dimérico o U2AF, identificada como un sitio importante de regulación del ajuste: la subunidad U2AF de 65 kDa interactúa con el tracto de pirimidinas, mientras que la subunidad más pequeña de 35 kDa se pone en contacto directamente con la secuencia del sitio de ajuste en 3' (Fig. 2). Por lo tanto, una explicación frecuente del efecto de la mutación c.-32 IVS1-13 podría ser que la transición de T a G debilita la fuerza del tracto de polipirimidinas, que no podría reclutar U2AF más eficazmente. No obstante, el hecho de que el consenso de Py varíe en longitud y secuencia para cada intrón no respalda dicha suposición. En lugar de eso, planteamos la hipótesis de que la transición de T a G podría haber alterado la retirada correcta del intrón 1 modificando la estructura secundaria del preARNm al nivel de su sitio aceptor 3', haciéndolo, por tanto, ineficaz. Para investigar esta hipótesis y desarrollar un tratamiento intervencionista de corrección del ajuste para estos pacientes (por ejemplo, que tienen la mutación c.-32 IVS1-13), los autores de la presente invención analizaron la definición del delimitador de intrón1/exón 2 del gen GAA y sus estructuras secundarias previstas usando la Human-Splicing-Finder (HSF) ([www.umd.be/HSF/](http://www.umd.be/HSF/)) y el programa informático RNAfold de *ViennaRNA Web Services*. La figura 3 muestra la localización de los factores determinantes clave del ajuste en el delimitador de intrón 1/exón 2, tal como el punto de ramificación (cugAg), el tracto de pirimidinas (ccgcuuucucucc), el sitio de ajuste 3' (SA1). También muestra los supuestos sitios de potenciadores de ajuste exónicos (ESE) a los que se unen las proteínas de activadores del ajuste, incrementando la probabilidad de que un sitio cercano se use como un punto de unión del ajuste. El análisis con HSF reveló un rasgo característico inesperado del exón 2: su región 5' (para ser precisos, los primeros 40 nucleótidos) carecía de sitios de ESE, pero presentaba al menos tres ESS (silenciador de ajuste exónico), que se podrían unir a los represores del ajuste, tal como la ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1 (hnRNP A1). Las proteínas hnRNP A1 se pueden unir a ARN monocatenarios de manera cooperativa, lo que puede desenrollar las estructuras secundarias del ARN y se propaga preferentemente en una dirección 3' a 5' para desplazar finalmente las proteínas SR unidas a los sitios de ESE. De forma interesante, el análisis con RNAfold mostró diferencias importantes para las estructuras secundarias previstas de la región que abarca desde el nucleótido -30 a +39 en secuencia normal o secuencia mutada (T>G en -13). En ambos casos, las estructuras previstas de MFE (energía libre mínima) mostraron que esta región particular del preARNm [-30;+39] probablemente podría formar una horquilla, aunque dicha estructura se reforzó en el mutante: para la secuencia normal, la energía libre del conjunto termodinámico fue aproximadamente -18,38 kcal/mol, la frecuencia de la estructura de MFE en el conjunto fue un 20,46 % y la diversidad del conjunto fue 22,37; para la secuencia mutante, la energía libre del conjunto termodinámico fue -22,02 kcal/mol, la frecuencia de la estructura de MFE en el conjunto fue un 36,35 % y la diversidad del conjunto fue 9,68. Estas estructuras predictivas permitieron a los autores de la presente invención proponer una explicación para el mecanismo mediante el cual la mutación T>G actúa sobre el ajuste correcto del exón 2. En primer lugar, en la normal, el preARNm alrededor del sitio aceptor tiende a formar una horquilla que potencialmente obstaculiza la reacción de ajuste. Afortunadamente, la fuerza de esta horquilla sería razonablemente débil y se podría desenrollar fácilmente por la hnRNP A1 que no compite con proteínas SR unidas un poco más lejos en 3'. Segundo, en la mutante, la misma región forma una horquilla fuerte que no puede ser vencida por hnRNP A1. Como resultado, la alta probabilidad de emparejamiento de bases de los nucleótidos implicados en esta estructura secundaria hace casi inaccesibles algunas secuencias consenso fundamentales en el extremo 3' del intrón 1, tal como el sitio aceptor, el tracto de pirimidinas para el reclutamiento de U2AF y el sitio de ramificación. De acuerdo con estas suposiciones, los autores de la presente invención propusieron un procedimiento para rescatar el ARNm de la GAA de longitud completa en células de pacientes con la mutación c.-32 IVS1-13 T>G usando oligonucleótidos antisentido (tríciclo-ADN) que se diseñaron para hibridar la región 5' del exón 2 (Fig. 4), que está implicada en la supuesta horquilla descrita anteriormente, permitiendo, de este modo, liberar el sitio aceptor del exón 2 y sus elementos en cis en dirección 5' (Py y sitio de ramificación).

## RESULTADOS

Se cultivaron en tejido Fibroblastos aislados de biopsias cutáneas de pacientes con GSD II con la mutación c.-32 IVS1-13 (la segunda mutación fue c.546 T>G que hibridaba en el sitio donante 3' del exón 2) y se transfectaron con diferentes cantidades de oligonucleótidos tc-PS-ADN (AON-1; AON-2; AON-3). Dos días después de la transfección, se recogieron las células y se extrajo el ARN total para llevar a cabo un análisis mediante RT-PCR para evaluar la integridad del ARNm de la GAA. La figura 5 muestra los amplicones subsiguientes obtenidos usando PCR con cebadores internos con diferentes conjuntos de cebadores diseñados para evaluar la presencia del exón 2 en el ARNm final. Como se esperaba, el conjunto de cebadores (Fex1-Rex3 seguido de F2-R3) permitió la detección de un amplicón de aproximadamente 670 pares de bases que englobaba el exón 2. Dicha amplificación no se produjo cuando se usaron células de pacientes, confirmándose, por tanto, que la inclusión del exón 2 en el ARNm final se veía afectada espectacularmente por el contexto de la mutación. Sin embargo, en presencia de cualquier AON sometido a prueba (AON-1; AON-2; AON-3) que se dirige a la región [+3;+31], se detectó directamente un amplicón de 670 pb. indicativo de rescate de ARNm de la GAA en células de pacientes (Fig. 5 A). La traducción eficaz del ARNm de la GAA rescatado se confirmó además mediante análisis por inmunoelectrotransferencia usando extractos de proteínas totales en células tratadas (Fig. 5 B).

Estos experimentos demuestran que la mutación c.-32 IVS1-13 T>G se puede rescatar por medio de enfoques de modulación de ajuste usando oligómeros de triciclo-ADN de acuerdo con la presente invención.

**EJEMPLO 2**

Se llevaron a cabo experimentos similares a los descritos en el ejemplo 1 usando oligómeros de 2'-O-Met (Fig. 6), confirmándose, por tanto, que se pueden usar diferentes químicas para la síntesis de oligonucleótidos antisentido sintéticos para el rescate de GAA en células con GSD II con c.-32 IVS1-13 T>G.

5 **EJEMPLO 3**

Se llevaron a cabo experimentos similares a los descritos en los ejemplos 1 y 2 usando el sistema U7 (Fig. 7), confirmándose, por tanto, que se pueden usar otras químicas antisentido tales como ARNnp genomanipulados para el rescate de GAA en células con GSD II con c.-32 IS1-13 (Fig. 8).

**MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS**10 **Células:**

Se derivaron cultivos de fibroblastos primarios de biopsias cutáneas de pacientes con GSD II (Banco de células del Hospital Cochin). Los reactivos y medios de cultivo fueron productos de GIBCO-Invitrogen a menos que se indique de otro modo.

15 Se disociaron los fibroblastos cutáneos mediante incubación de muestras cutáneas con colagenasa de tipo 1A (Sigma) y se cultivaron en medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % (Sigma), 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin. Cuando fue necesario, estas células se convirtieron en progenitores miogénicos por transducción con un lentivector que codifica un gen MyoD inducible por doxiciclina. Se incubaron aproximadamente de 600 a 1200 partículas víricas por célula con fibroblastos durante al menos 4 horas. Se usaron fibroblastos y miofibroblastos transducidos para estudios de transfección usando oligonucleótidos antisentido.

20 **Secuencias antisentido dirigidas al exón 2 del producto génico de GAA:**

Los autores de la presente invención diseñaron 3 secuencias antisentido que podían hibridar con la región 5' del exón 2 de la  $\alpha$ -glucosidasa ácida humana: en primer lugar, del nucleótido +3 al nucleótido +17; segundo, de la posición +7 a +21; y tercero, de la posición +17 a +31.

25 Se sintetizaron oligonucleótidos antisentido como oligómeros de 2'-O-Met y triciclo (tc)-ADN. También se introdujeron secuencias antisentido en el sistema génico U7OPT mediante PCR como se describe previamente (Goyenvalle *et al.*, 2004). El casete U7OPT-AS resultante se introdujo en el vector pRR1 (para la producción de lentivector) en los sitios de restricción NheI y XbaI. La síntesis de triciclo-nucleósidos es conocida en la técnica, por ejemplo, como se describe en Steffens R, *et al.*, 1997, *Helv Chim Acta* 80:2426-2439; Renneberg D, *et al.*, *J Am Chem Soc*, 2002, 124:5993-6002; documento WO 2013/053928; y referencias citadas en los mismos). La síntesis del oligonucleótido de 2'-O-metilfosforotioato (2'-O-Met) también es conocida por los expertos en la técnica (documento WO 2013/112053 y referencias citadas en el mismo).

30

**Transfección:**

Los autores de la presente invención usaron dos concentraciones (10 µg y 25 µg) de los tres oligonucleótidos antisentido (AON) para transfectar fibroblastos de pacientes con GSDII. Las células ( $20 \times 10^3$  a  $60 \times 10^3$ ) se colocaron en pocillos P6. Para cada pocillo, se diluyeron 10 o 25 µg de AON en 90 µl de DMEM, se complejaron con 12 µl de oligofectamina y se incubaron durante 20 minutos. Después de la adición de 800 µl del medio libre a la mezcla de AON, las células se incuban a 37 °C con esta mezcla y se diluyen cuatro horas más tarde en otro 1 ml del medio de proliferación.

35

**Producción de lentivector:**

40 LV (U7opt-AS[+3;+31]) se produjo como se describe previamente (Dull T, *et al.*; *J Virol*, 1998, 72(11): 8463-8471; Benchaouir R., *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2007, 1(6):646-657).

**Transducción:**

45 Se incubaron fibroblastos de pacientes con GSDII ( $25 \times 10^3$  células) en 100 µl de DMEM suministrado con diferentes cantidades (10; 5 o 1 µl) de una preparación concentrada de LV (U7opt-AS [+3;+31]) durante 4 horas 37 °C. A continuación, se expandieron las células en medio de proliferación (DMEM complementado con un 10 % de suero bovino fetal).

**PCR con cebadores internos:**

50 48 h después de la transfección, se recogieron las células y se extrajo el ARNm usando el kit RNeasy de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). De 0,5 a 2 ng de muestra de ARN total se retrotranscribió en ADNc con Super-Script II RT (SSIIR Invitrogen) cebado mediante hexámeros aleatorios de acuerdo con el fabricante. La inclusión del exón 2 en el ARNm de la GAA se analizó mediante RT-PCR con cebadores internos. La primera

- 5 amplificación por PCR se realizó usando 3 µg de ADNc en una reacción de 50 µl con los cebadores externos que rodeaban el exón 2 (Fex1 -Rex3). La síntesis primaria se realizó con 30 ciclos de 94 °C (30 segundos), 58 °C (1 minuto) y 72 °C (2 minutos). A continuación, se reamplificaron tres microlitros de la primera reacción en PCR con cebadores internos mediante 25 ciclos de 94 °C (30 segundos), 58 °C (1 minuto) y 72 °C (2 minutos) usando los cebadores internos que hibridaban dentro del exón 2. Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % teñido con bromuro de etidio.

Fex1: 5' AGCTGACGGGGAAACTGAG 3'	(SEQ ID NO:7)
Rex4: 5' AAGGTCCCGTTCCACAG 3'	(SEQ ID NO:8)
Rex3: 5' GCTCCTCGGAGAACTCCAC 3'	(SEQ ID NO:9)
Fex2: 5' CTGTCCAGGCCATCTCCA 3'	(SEQ ID NO:10)
Rex2: 5' AGTCTCCATCATCACGTCCA 3'	(SEQ ID NO:11)

**Análisis mediante inmunoelectrotransferencia:**

- 10 La masa molecular de la alfa-glucosidasa ácida humana se analizó el día 3 después de la transfección en los fibroblastos sanos, carentes y tratados con Tc-ADN. Las células se lavaron dos veces con PBS, se tripsinizaron y se sedimentaron. Los lisados de proteínas de las células se resolvieron mediante SDS-PAGE y se transfirieron durante la noche a nitrocelulosa. La proteína específica se detectó usando un anticuerpo policlonal de cabra producido contra GAA humana. Los inmunocomplejos se visualizaron usando un antisuero de conejo contra inmunoglobulina de cabra y quimioluminiscencia.

15 **Análisis histoquímico:**

El almacenamiento de glucógeno se determinó mediante tinción con PAS. Las células cultivadas de control y tratadas se enjuagaron en PBS durante 5 min, seguido de incubación en reactivo de Schiff durante 15 min a temperatura ambiente. Se analizaron por microscopía óptica.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Synthena AG

<120> ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE POMPE

5 <130> P3266PC00

<150> EP 13184013.4¶

10 <151> 2013-09-11

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1  
<211> 578  
<212> ADN  
<213> homo sapiens

20 <400> 1

gcctgtagga gctgtccagg ccatctccaa ccatgggagt gaggcacccg ccctgctccc	60
accggctcct ggccgtctgc gccctcgtgt ccttggcaac cgctgcactc ctggggcaca	120
tcctactcca tgatttctg ctggttcccc gagagctgag tggctcctcc ccagtccctgg	180
aggagactca cccagctcac cagcagggag ccagcagacc agggccccgg gatgcccag	240
cacacccccg ccgtcccaga gcagtgccca cacagtgcga cgtccccccc aacagccgct	300
tcgattgcg ccttgacaag gccatcacc aggaacagtg cgaggcccgc ggctgttgct	360
acatccctgc aaagcagggg ctgcagggag cccagatggg gcagccctgg tgcttcttcc	420
caccagcta cccagctac aagctggaga acctgagctc ctctgaaatg ggctacacgg	480
ccaccctgac ccgtaccacc cccaccttct tccccaaagga catcctgacc ctgcggctgg	540
acgtgatgat ggagactgag aaccgcctcc acttcacg	578

<210> 2

25 <211> 15  
<212> ARN  
<213> artificial

<220>

30 <223> secuencia diana

<400> 2

cuguaggagc ugucc	15
------------------	----

35 <210> 3  
<211> 15  
<212> ARN  
<213> artificial

40 <220>  
<223> secuencia diana

<400> 3

aggagcuguc caggc	15
------------------	----

45

ES 2 739 850 T3

<210> 4  
<211> 15  
<212> ARN  
<213> artificial  
5  
<220>  
<223> secuencia diana  
<400> 4  
10 **caggccaucu ccaac 15**  
<210> 5  
<211> 44  
<212> ARN  
15 <213> artificial  
<220>  
<223> secuencia diana  
20 <400> 5  
**cuguaggagc uguccaggcc aucuccaacc augggaguga ggca 44**  
<210> 6  
<211> 57  
25 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido antisentido modificado con U7  
30 <400> 6  
**guuggagaug gccuggacag cuccuacagg uuuucugacu ucggucggaa aaccccu 57**  
<210> 7  
35 <211> 19  
<212> ADN  
<213> artificial  
<220>  
40 <223> cebador  
<400> 7  
**agctgacggg gaaactgag 19**  
45 <210> 8  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> artificial  
50 <220>  
<223> cebador  
<400> 8  
55 **aaggtcccgg ttccacag 18**  
<210> 9  
<211> 19  
<212> ADN  
60 <213> artificial  
<220>  
<223> cebador  
<400> 9

**gctcctcgga gaactccac**            **19**  
 <210> 10  
 <211> 18  
 5 <212> ADN  
    <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 10  
 <400> 10  
**ctgtccaggc catctcca**            **18**  
  
 <210> 11  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
    <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador  
 20  
 <400> 11  
**agtctccatc atcacgtcca**            **20**  
  
 <210> 12  
 <211> 29  
 25 <212> ARN  
    <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> secuencia diana  
 30  
 <400> 12  
**cuguaggagc uguccaggcc aucuccaac**            **29**  
 35  
 <210> 13  
 <211> 43  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 40  
 <220>  
 <223> secuencia diana  
  
 <400> 13  
 45 **cuguaggagc uguccaggcc aucuccaacc augggaguga ggc**            **43**  
  
 <210> 14  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 50 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido antisentido AON1  
 55 <400> 14  
**ggacagctcc tacag**            **15**  
  
 <210> 15  
 <211> 15  
 60 <212> ADN  
    <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> oligonucleótido antisentido AON2

<400> 15  
 gcctggacag ctct 15

5 <210> 16  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> oligonucleótido antisentido AON3

<400> 16  
 gttggagatg gcctg 15

15 <210> 17  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 17  
 25 gttggagatg gcctggacag ctcttacag 29

<210> 18  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 30 <213> artificial

<220>  
 <223> U7opt-AS[+3;+31]

35 <400> 18  
 guuggagaug gccuggacag cuccuacaga auuuuuggag cagguuuucu gacuucgguc 60

ggaaaacccc u 71

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico de 10 a 50 nucleótidos de longitud, complementario de una secuencia de nucleótidos del preARMm de la alfa-glucosidasa ácida, pudiendo corregir dicho ácido nucleico el ajuste del exón 2 del preARMm de la alfa-glucosidasa alfa, en el que dicha molécula de ácido nucleico comprende, o preferentemente consiste en, una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+45] del exón 2 del gen de la alfa-glucosidasa alfa.
2. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha molécula de ácido nucleico puede corregir el ajuste del exón 2 del preARNm de la alfa-glucosidasa ácida humana que presenta la mutación c.-32-13T>G.
- 10 3. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha secuencia de nucleótidos es complementaria de una o más de las secuencias definidas por las posiciones 3-17, 7-21 o 17-31 en SEQ ID NO: 1 o en una secuencia teniendo al menos un 90 % de homología con SEQ ID NO: 1.
- 15 4. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha secuencia de nucleótidos es complementaria de una de las secuencias que comprenden o que consisten en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.
5. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen de la alfa-glucosidasa ácida humana (SEQ ID NO: 1).
- 20 6. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria de una secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen de la alfa-glucosidasa ácida humana (SEQ ID NO: 1), en la que dicha secuencia comprendida en la región definida por las posiciones [+3;+31] del exón 2 del gen de la alfa-glucosidasa ácida humana (SEQ ID NO: 1) tiene una longitud de al menos 10 hasta como máximo 29 nucleótidos.
- 25 7. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende o es un oligonucleótido antisentido.
8. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en oligodesoxirribonucleótidos, oligorribonucleótidos, morfolinos, oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN, oligonucleótidos antisentido de triciclo-fosforotioato ADN, oligonucleótidos LNA y una molécula de ácido nucleico modificada en U7 o U1.
- 30 9. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en oligonucleótidos antisentido triciclo-ADN.
10. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en oligonucleótidos antisentido de triciclo-fosforotioato ADN.
- 35 11. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17.
- 40 12. La molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha molécula de ácido nucleico está unida a un ARNnp de U7 modificado.
13. La molécula de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la enfermedad de Pompe.
14. La molécula de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el paciente con enfermedad de Pompe alberga la c.-32 IVS1-13 T>G o una mutación IVS1.-3 C>N en el gen de la alfa-glucosidasa ácida, y en la que, preferentemente, el paciente con enfermedad de Pompe alberga la mutación c.-32-13 T>G en el gen de la alfa-glucosidasa ácida humana.
- 45 15. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

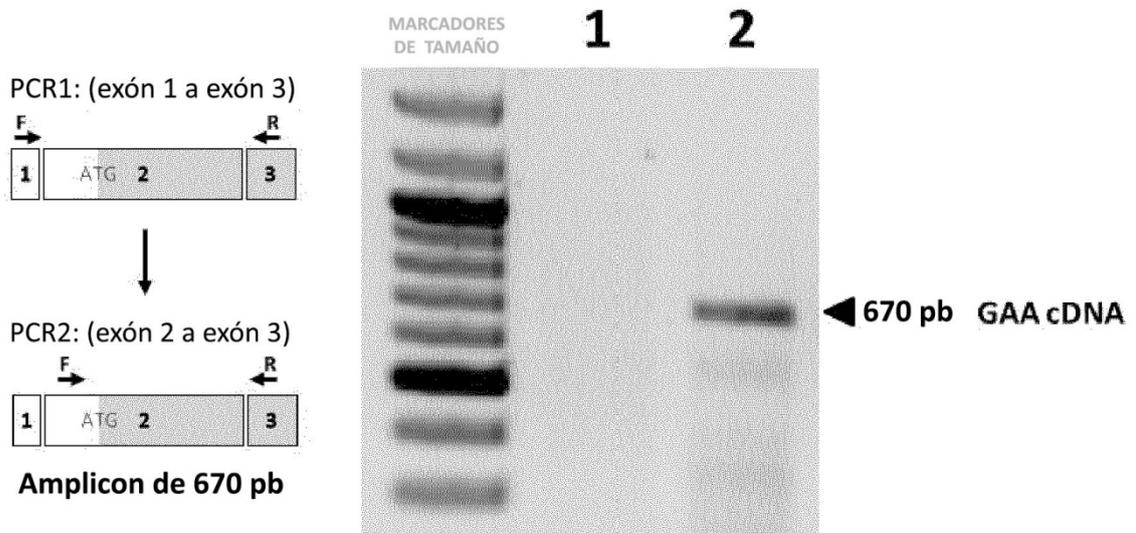


Figura 1

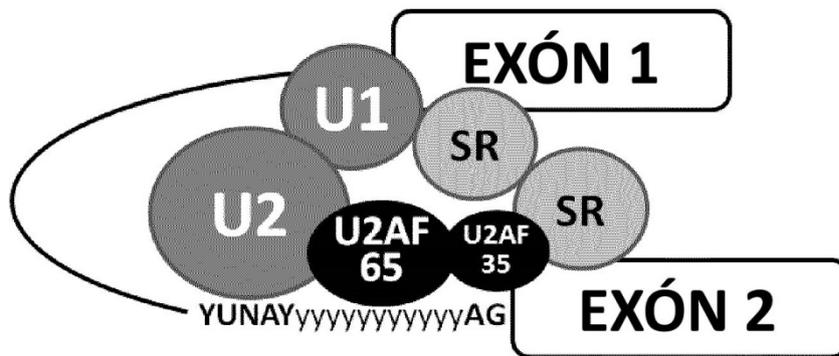
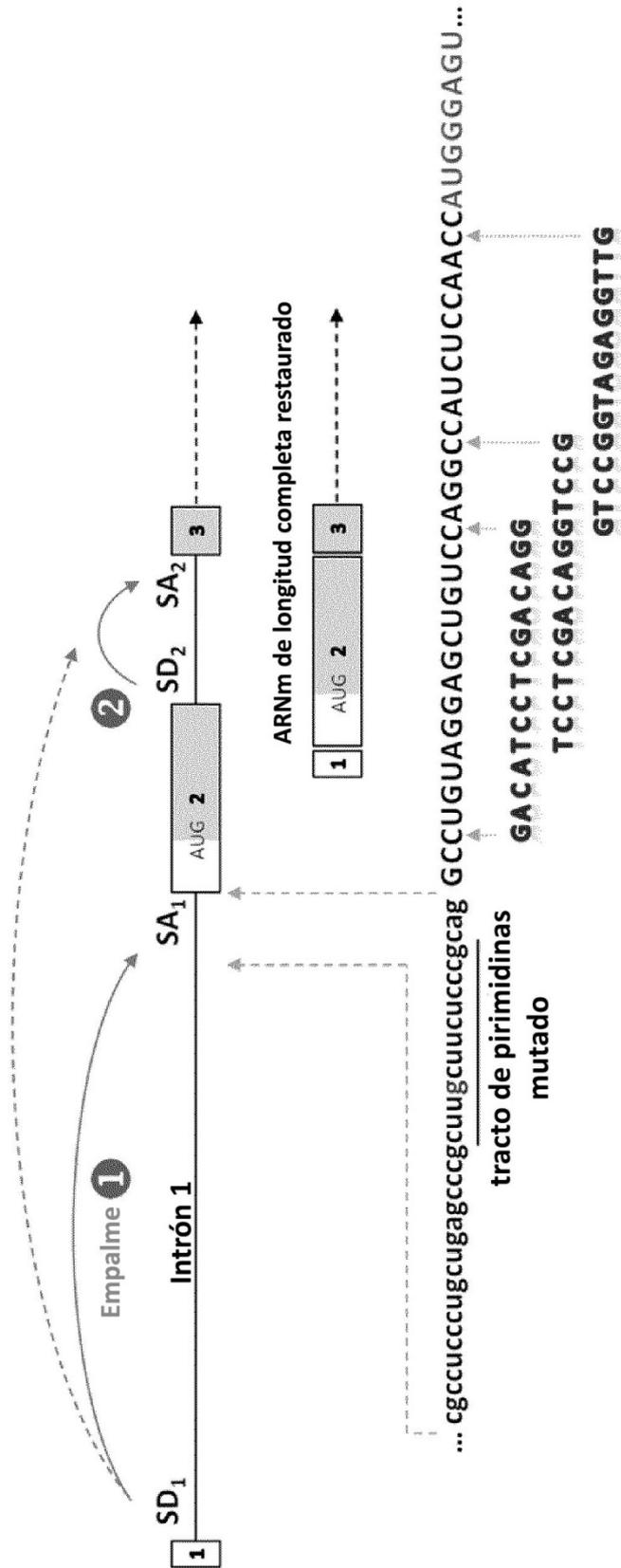


Figura 2





## OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO

Figura 4

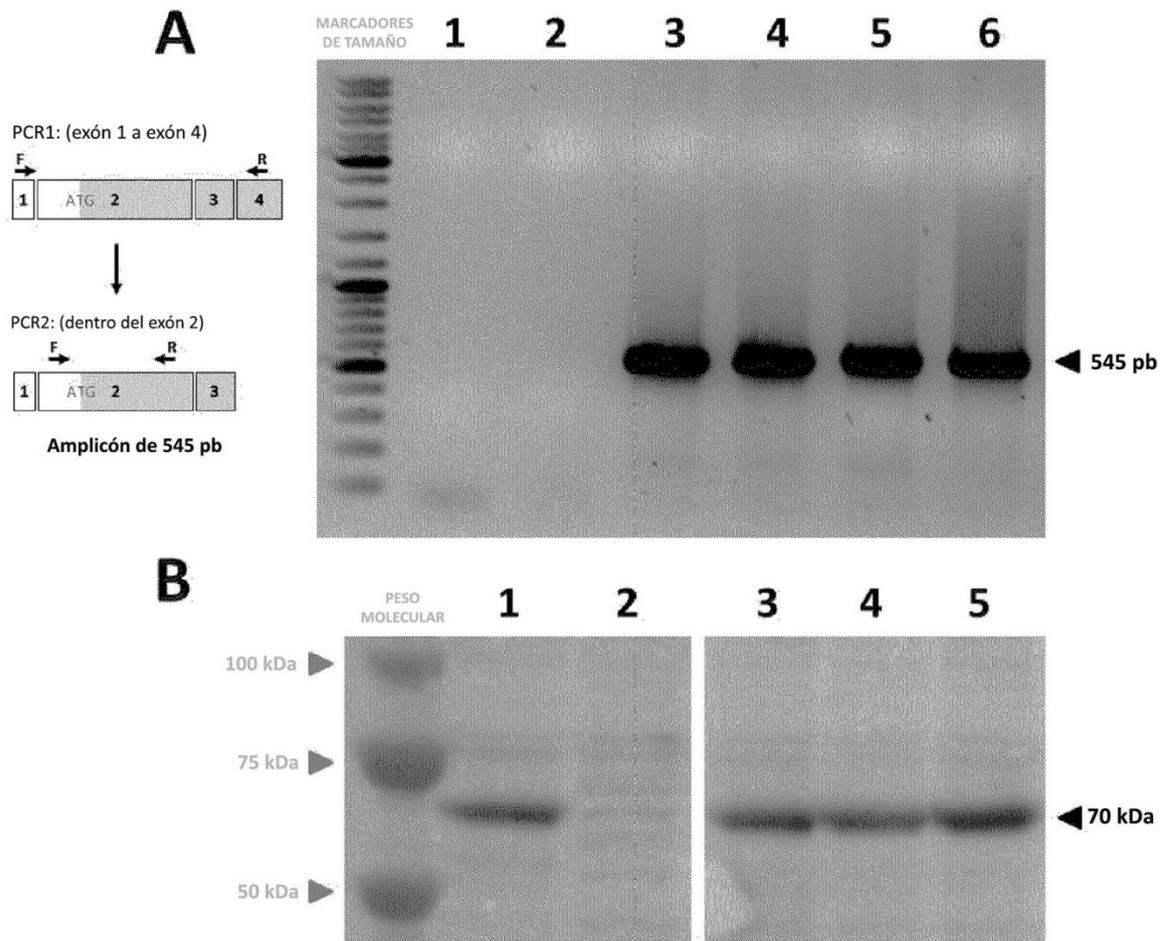


Figura 5

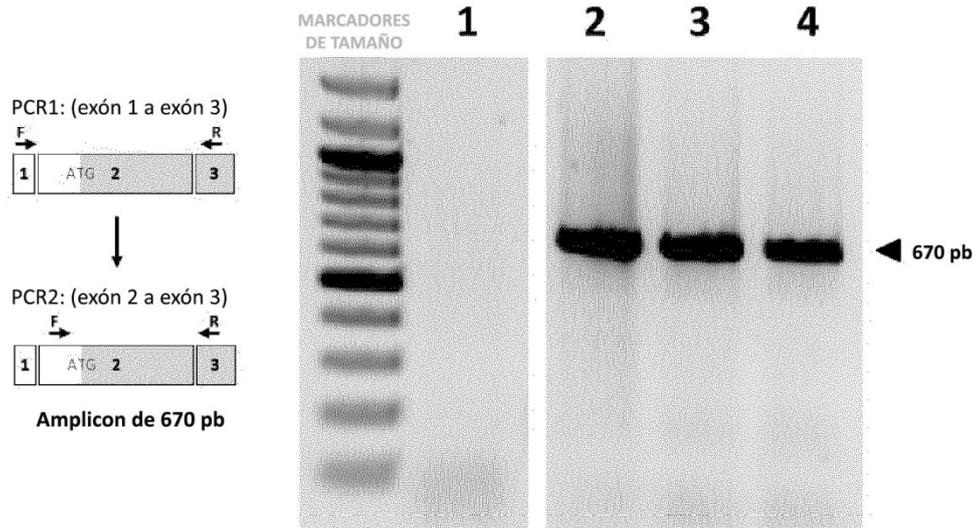


Figura 6



**Figura 7**

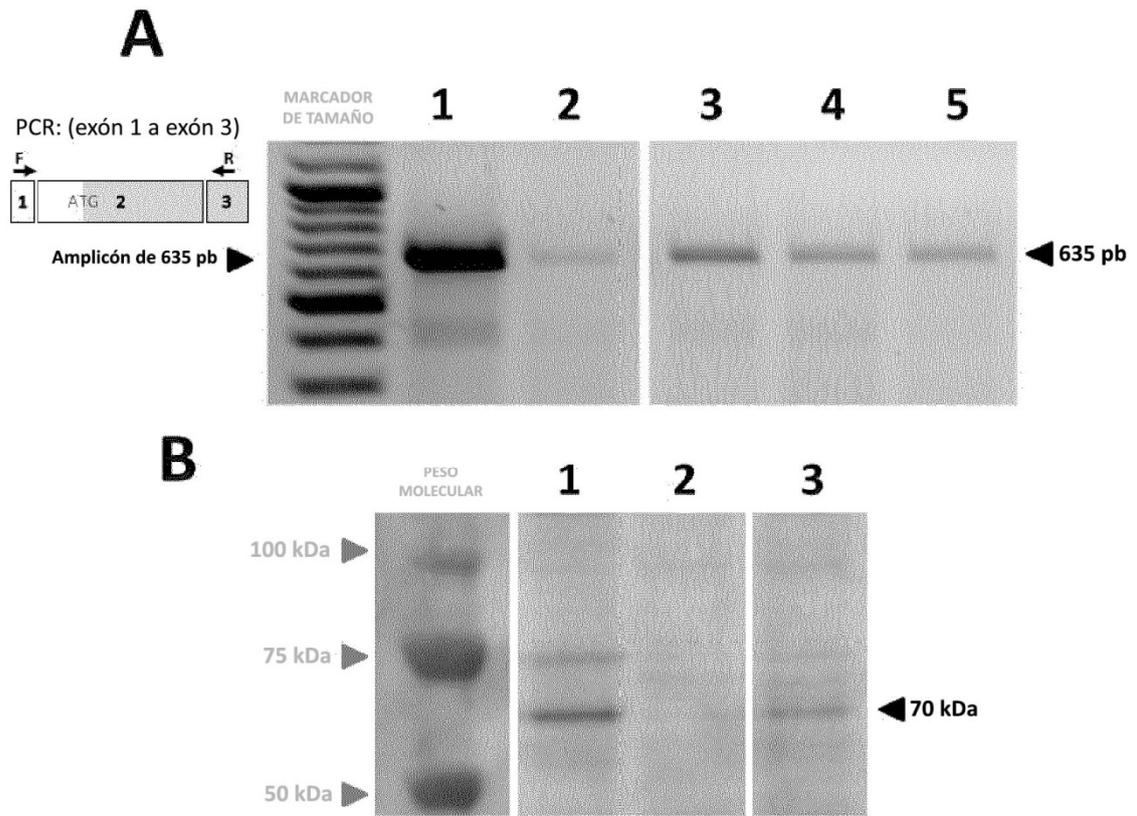


Figura 8