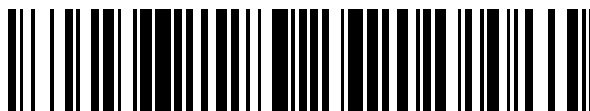


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 302**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2014 PCT/US2014/054151**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15035091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2014 E 14842672 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3041958**

54 Título: **Reducción de la degradación de ARNm con mediación sin sentido**

30 Prioridad:

**04.09.2013 US 201361873780 P**

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

**14.08.2020**

73 Titular/es:

**COLD SPRING HARBOR LABORATORY (100.0%)  
One Bungtown Road, Nicholas Building, P.O. Box  
100  
Cold Spring Harbor, NY 11724, US**

72 Inventor/es:

**KRAINER, ADRIAN;  
AZNAREZ, ISABEL y  
NOMAKUCHI, TOMOKI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 779 302 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

Reducción de la degradación de ARNm con mediación sin sentido

## ANTECEDENTES

La mutación causal en muchas enfermedades genéticas es una mutación terminadora. Se necesitan enfoques adicionales para tratar o prevenir enfermedades en las que las mutaciones terminadoras desempeñan un papel.

KUZMIAK ET AL., "Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges", TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, (2006), vol. 12, no. 7, páginas 306 – 316, repasan cómo determinar qué codones de terminación prematura provocan la degradación de ARNm con mediación sin sentido, lo que se sabía sobre el mecanismo de la degradación de ARNm con mediación sin sentido, y la información adicional que los autores creían pertinente para establecer terapias para enfermedades asociadas al codón de terminación prematura.

GONG ET AL., "Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay by antisense morpholino oligonucleotides restores functional expression of hERG nonsense and frameshift mutations in long-QT syndrome", JOURNAL OF MOLECULAR AND CELLULAR CARDIOLOGY, (2011), vol. 50, no. 1, páginas 223 – 229, describen el uso de morfolin oligonucleótidos antisentido para inhibir el ajuste de intrones en dirección 3' de ARNm mutante como una estrategia para prevenir la degradación con mediación sin sentido de ese ARNm mutante, y sugieren el uso de tales oligonucleótidos como terapias potenciales, y RODRIGUEZ-PASCAU ET AL., "Antisense oligonucleotide treatment for a pseudoexon-generating mutation in the NPC1 gene causing Niemann-Pick type C disease", HUMAN MUTATION, vol. 30, no. 11, páginas E993 - E1001, describen el uso de oligonucleótidos antisentido para seleccionar como diana a un sitio de ajuste críptico en un ARNm mutante, mediante lo cual el oligonucleótido, al prevenir el ajuste aberrante del ARNm mutante, podría restaurar el ajuste y la generación normales de la proteína de tipo salvaje, y proponen tal método como un enfoque terapéutico.

## SUMARIO

En el presente documento se proporcionan oligonucleótidos antisentido (ASOs) como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Como se describe en el presente documento, los oligonucleótidos antisentido (ASOs) son capaces de inhibir el depósito del complejo de la unión de exones (EJC) y, en el contexto de transcritos que contienen mutaciones terminadoras, inhiben la degradación de ARNm con mediación sin sentido (NMD) de los transcritos. También se describen en el presente documento métodos para inhibir la NMD de una manera específica de un gen, tal como en el tratamiento de una enfermedad o trastorno causado por una mutación terminadora, o la reducción del grado en el que ocurre una enfermedad o trastorno, y composiciones útiles para inhibir la NMD de una manera específica de un gen, incluyendo los métodos descritos en el presente documento.

Los métodos y composiciones descritos en el presente documento son capaces de inhibir la NMD de una manera específica de un gen al dirigirse específicamente a un gen que está asociado con una enfermedad o un gen que contiene una mutación que causa una enfermedad (por ejemplo, una mutación terminadora). La mutación que causa una enfermedad puede dar como resultado un codón de terminación prematura (PTC). En algunos casos, el gen contiene un PTC que es de origen natural, por ejemplo el PTC no resulta de una mutación. En algunas realizaciones, el PTC da como resultado la NMD del transcrito y cantidades reducidas del polipéptido codificado por el gen. Los ASOs descritos en el presente documento se unen específicamente a un ácido nucleico en un ARNm diana e inhiben la NMD, dando como resultado una mayor producción del polipéptido, o polipéptido truncado, codificado por el gen.

También se proporcionan en el presente documento métodos *ex vivo* como se definen en las reivindicaciones adjuntas al mismo. De este modo, también se describen en el presente documento métodos para inhibir la degradación con mediación sin sentido (NMD) de ARNm de una manera específica de un gen en una célula eucariota. El método descrito implica poner en contacto (a) una célula eucariota que comprende (i) un ácido nucleico que contiene un codón de terminación prematura (PTC) que causa una enfermedad, o un codón de terminación prematura (PTC) de origen natural, y (ii) ARNm codificado por el ácido nucleico, con (b) un oligonucleótido antisentido (ASO) específico para y suficientemente complementario a una región del ARNm que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón que (i) se encuentra en dirección 3' del PTC y, (ii) cuando está marcado por el depósito de complejos de la unión de exones (EJC), marca el ARNm para la degradación con mediación sin sentido, en condiciones en las que el ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en la unión exón-exón e inhibir la NMD del ARNm que contiene el PTC. En algunos casos, el ASO entra en el núcleo de la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en la unión exón-exón e inhibir la NMD del ARNm que contiene el PTC. En algunos casos, el PTC que causa una enfermedad resulta de una mutación. En algunos casos, el ASO es específico de una región del ácido nucleico que está de alrededor de 20 a alrededor de 24 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón. En algunos casos, el ASO tiene no menos de 14 nucleótidos de longitud (al menos 14 nucleótidos de longitud). En algunos casos, el ácido nucleico es un alelo HBB que contiene una mutación terminadora (por ejemplo, el alelo HBB puede ser CM810001, CM880039, CM034660, CM880040, o CM900122). En algunos casos, el ASO se selecciona de SEQ ID NOs: 1-19. En algunos

casos, el ASO es SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16. En otros casos, el ácido nucleico es un alelo MECP2 que contiene una mutación terminadora (por ejemplo, el alelo MECP2 es CM060329, CM023409, HM971529, CM010332, CM057720, CM010333, CM035705, CM055984, o CM076290). En algunos casos, el ASO se selecciona de SEQ ID NOs:20-38. En algunos casos, el ASO se selecciona de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, o SEQ ID NO:32. En algunos casos, la célula eucariota se encuentra en un individuo, tal como en un ser humano.

También se describe un método para inhibir el depósito de complejos de la unión de exones (EJC) de una manera específica de un gen en una célula eucariota. El método comprende introducir, en una célula eucariota que comprende una unión exón-exón que está (i) en dirección 3' de un codón de terminación prematura que causa una enfermedad, o un codón de terminación prematura (PTC) de origen natural, en el ARNm transcrito en la célula eucariota y (ii) que está unida por un complejo de la unión de exones (EJC) que identifica (marca) el ARNm para la degradación con mediación sin sentido (NMD), un oligonucleótido antisentido (ASO) específico para el ARNm de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de la unión exón-exón, en cantidad suficiente y bajo condiciones en las que el ASO bloquea la unión o depósito de EJC a la unión exón-exón. En un caso, el método implica (a) identificar (determinar la ubicación de) una unión exón-exón que está (i) en dirección 3' de un codón de terminación prematura que causa una enfermedad, o un codón de terminación prematura (PTC) de origen natural, en el ARNm transcrito en la célula eucariota y que está (ii) unida por un complejo de la unión de exones (EJC) que identifica (marca) el ARNm para la degradación con mediación sin sentido (NMD); y (b) introducir en la célula un oligonucleótido antisentido (ASO) específico para el ARNm de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de la unión exón-exón identificada en (a), en cantidad suficiente y en condiciones en las que el ASO bloquea la unión o depósito de EJC a la unión exón-exón. En algunos casos, el PTC que causa una enfermedad resulta de una mutación. En algunos casos, el ASO es específico de una región del ácido nucleico que está de alrededor de 20 a alrededor de 24 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón. En algunos casos, el ASO tiene no menos de 14 nucleótidos de longitud (al menos 14 nucleótidos de longitud). En algunos casos, el ASO tiene 18 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el ARNm se transcribe desde un alelo HBB que contiene una mutación terminadora, tal como CM810001, CM880039, CM034660, CM880040, o CM900122. En algunos casos, el ASO se selecciona de SEQ ID NOs: 1-19. En algunos casos, el ASO es SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16. En algunos casos, el ARNm se transcribe desde un alelo MECP2 que contiene una mutación terminadora, tal como CM060329, CM023409, HM971529, CM010332, CM057720, CM010333, CM035705, CM055984, o CM076290. En algunos casos, el ASO se selecciona de SEQ ID NOs:20-38. En algunos casos, el ASO se selecciona de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:32. En algunos casos, la célula eucariota se encuentra en un individuo, por ejemplo un ser humano.

También se describe en el presente documento un método para aumentar la cantidad de una proteína truncada codificada por un gen que contiene un codón de terminación prematura (PTC) producido en una célula eucariota. El método implica (a) identificar (determinar la ubicación de) una unión exón-exón que está en dirección 3' de un codón de terminación prematura que causa una enfermedad, o un codón de terminación prematura (PTC) de origen natural, en el ARNm transcrito en la célula eucariota; y (b) introducir en la célula eucariota un oligonucleótido antisentido (ASO) específico de una región del ARNm que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón identificada en (a), para el que el depósito de complejos de la unión de exones (EJC) marca el ARNm para la degradación con mediación sin sentido, en condiciones en las que el ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de un EJC en dirección 5' de la unión exón-exón que se encuentra en dirección 3' del PTC e inhibe la NMD del ARNm que contiene el PTC y se produce la producción de proteínas. En algunos casos, el PTC que causa una enfermedad resulta de una mutación. En algunos casos, el ASO es específico de una región del ácido nucleico que está de alrededor de 20 a alrededor de 24 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón. En algunos casos, el ASO tiene no menos de 14 nucleótidos de longitud (al menos 14 nucleótidos). En algunos casos, el método comprende además administrar un compuesto que promueve la lectura de los PTCs. En algunos casos, el compuesto que promueve la lectura de los PTCs es ataluren o un aminoglicósido. En algunos casos, el aminoglicósido es amikacina, arbekacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rhodoestrepomicina, estreptomicina, tobramicina, apramicina, G418 (geneticina), lividomicina, o un análogo de aminoglicósido escogido de NB30, NB54, o NB84. En algunos casos, la célula eucariota se encuentra en un individuo, por ejemplo un ser humano.

También se describe en el presente documento un método para aumentar la eficacia de un fármaco de lectura en una célula eucariota. El método comprende:

(a) identificar (determinar la ubicación/secuencia de) una unión exón-exón que está en dirección 3' de un codón de terminación prematura (PTC) que causa una enfermedad o de origen natural en el ARNm transcrito en una célula eucariota;

(b) introducir en la célula eucariota un oligonucleótido antisentido (ASO) específico de una región del ARNm que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de la unión exón-exón identificada en (a), para el que el depósito de complejos de la unión de exones (EJC) marca el ARNm para la degradación con mediación sin sentido, en condiciones en las cuales (i) el ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en la unión exón-exón e inhibe la NMD del ARNm que contiene el PTC, y (ii) se produce la producción de proteínas; y

(c) introducir en la célula eucariota una composición que promueva la lectura de PTC (un fármaco de lectura) en cantidad suficiente (y en condiciones bajo las cuales la composición entra en la célula) para producir cantidades de proteína de longitud completa traducida desde el ARNm que contiene el PTC mayores que las que se producirían en ausencia de ASO introducido en (b).

5 En algunos casos, el PTC que causa una enfermedad resulta de una mutación. En algunos casos, el ASO es específico de una región del ácido nucleico que está de alrededor de 20 a alrededor de 24 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón. En algunos casos, el ASO tiene no menos de 14 nucleótidos de longitud (al menos 14 nucleótidos de longitud). En algunos casos, el ARNm se transcribe desde un alelo *HBB* que contiene una mutación terminadora, tal como CM810001, CM880039, CM034660, CM880040, o CM900122. En algunos casos, el ASO se  
10 selecciona de SEQ ID NOs: 1-19. En algunos casos, el ASO es SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16. En algunos casos, el ARNm se transcribe desde un alelo *MECP2* que contiene una mutación terminadora, tal como CM060329, CM023409, HM971529, CM010332, CM057720, CM010333, CM035705, CM055984, o CM076290. En algunos casos, el ASO se selecciona de SEQ ID NOs: 20-38. En algunos casos, el ASO se selecciona de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:32. En algunos casos, la composición que promueve la lectura de los  
15 PTCs es ataluren o un aminoglicósido. En algunos casos, el aminoglicósido es amikacina, arbekacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rhodoestrepomicina, estreptomicina, tobramicina, apramicina, G418 (geneticina), lividomicina, o un análogo de aminoglicósido escogido de NB30, NB54, o NB84. En algunos casos, la célula eucariota está en un individuo, tal como un ser humano.

También se describe un método para tratar a un individuo que tiene o tiene un mayor riesgo de tener una  
20 enfermedad causada por una mutación que introduce un codón de terminación prematura (PTC) en un ARNm. El método comprende administrar al individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ASO que inhibe la NMD del ARNm que contiene PTC. En algunos casos, la enfermedad es  $\beta$ -talasemia. Por ejemplo, la  $\beta$ -talasemia es causada por un alelo *HBB* que contiene una mutación terminadora seleccionada de CM810001, CM880039, CM034660, CM880040 y CM900122. En algunos aspectos, el  
25 ASO, por ejemplo en el tratamiento de  $\beta$ -talasemia, se selecciona de SEQ ID NOs: 1-19. En algunos casos, el ASO para tratar  $\beta$ -talasemia es SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16. En algunos casos, la enfermedad a tratar es el síndrome de Rett. Por ejemplo, el síndrome de Rett es causado por un alelo *MECP2* que contiene una mutación terminadora seleccionada de CM060329, CM023409, HM971529, CM010332, CM057720, CM010333, CM035705, CM055984, y CM076290. En algunos casos, el ASO, por ejemplo en el tratamiento de síndrome de Rett, se selecciona de SEQ ID  
30 NOs: 20-38. En algunos casos, el ASO para tratar el síndrome de Rett se selecciona de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 y SEQ ID NO:32. En algunos casos, el método para tratar un individuo comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que promueve la lectura de PTCs. Por ejemplo, el compuesto es ataluren o un aminoglicósido. En algunos casos, el aminoglicósido es amikacina, arbekacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rhodoestrepomicina, estreptomicina, tobramicina, apramicina, G418 (geneticina), lividomicina, o un análogo de aminoglicósido escogido de NB30, NB54, o NB84.  
35

El sumario anterior pretende ilustrar, de manera no limitante, algunas de las realizaciones, ventajas, características y usos de la tecnología descrita en el presente documento. Otras realizaciones, ventajas, características y usos de la tecnología descrita en el presente documento serán evidentes a partir de la Descripción detallada, los Dibujos, los Ejemplos y las Reivindicaciones.

#### 40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 es una representación esquemática de una inmunoprecipitación de ARN (RIP), un tratamiento con MNasa, y un protocolo de RT-PCR para identificar uniones exón-exón unidas a EJC. Triángulo representa la etiqueta T7. Las barras horizontales azules y marrones representan cebadores que amplifican una región de 60 nt que abarca la unión exón-exón y la "región de control", respectivamente.

45 FIG. 2 es una representación esquemática de la microdeambulación (*microwalk*) de ASOs dirigida a la región de depósito de EJC. Las líneas azules en la parte superior de la figura representan ASOs de 15 meros desplazados en 1 nt, que cubren una región de 33 nt desde -6 hasta -38.

FIG. 3 es una representación esquemática de la estrategia para la microdeambulación de ASOs dirigida a múltiples uniones exón-exón.

50 FIG. 4A es una tabla que muestra los resultados de la RT-PCR radiactiva de células HeLa cotransfectadas con informadores *HBB* y ASOs, que demuestran un aumento en los niveles de ARNm de un transcrito de *HBB* que contiene PTC (T39) que resulta de la inhibición de NMD por ASO247 (SEQ ID NO:15) y ASO248 (SEQ ID NO:16). Los porcentajes de transcritos se normalizaron con respecto a WT.

55 FIG. 4B es un gráfico que demuestra el aumento en número de veces logrado por el ASO más potente dirigido al exón 2 de *HBB* (247, SEQ ID NO:15) en células U2OS que expresan el transcrito *HBB* Q39X, n = al menos 3.

FIG. 4C es una tabla que muestra los resultados de una transferencia Western sondada con anticuerpo anti-GFP. El aumento en número de veces en el nivel de proteína truncada correspondiente al transcrito Q39X tratado con ASO (247, SEQ ID NO:15).

5 FIG. 5 es una gráfica que demuestra el aumento en número de veces logrado por el ASO más potente dirigido con el exón 3 de *MECP2* (291, SEQ ID NO:25) en células U2OS que expresan el transcrito *MECP2* S65X, n = al menos 3.

10 FIG. 6A es una tabla que muestra los resultados de la RT-PCR radiactiva de las células transfectadas con los ASOs más potentes dirigidos contra las uniones CRTR en combinación, que demuestran un aumento en los niveles de ARNm de un transcrito *CFTR* que contiene PTC (W1282X) como resultado de la inhibición de NMD. Los porcentajes de transcritos se normalizaron frente a transcritos que contienen PTC sin tratar.

15 FIG. 6B es una gráfica que corresponde a los resultados de la RT-PCR radiactiva de células que expresan el minigen *CFTR* 22-17 transfectado con los ASOs más potentes dirigidos contra cada unión exón-exón en dirección 3' de la mutación W1282X de forma independiente (SEQ ID NO:65, SEQ ID NO:83 y SEQ ID NO:107, respectivamente). ASO (SEQ ID NO:107), que se dirige contra la última unión exón-exón, es el ASO más potente.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

20 Las mutaciones terminadoras introducen codones de terminación prematura (PTC) en los transcritos, lo que da como resultado proteínas truncadas, y a menudo, presentaciones de enfermedades graves. Los transcritos que contienen PTCs generalmente se degradan por la degradación de ARNm con mediación sin sentido (NMD), que a menudo afecta aún más a tales enfermedades.

25 Alrededor de un tercio de los alelos que causan enfermedades genéticas tienen mutaciones terminadoras que introducen PTCs (6). En los últimos años, se han realizado esfuerzos para desarrollar terapias de lectura traduccional para el tratamiento de enfermedades causadas por mutaciones terminadoras. PTC Therapeutics (South Plainfield, New Jersey) desarrolló un medicamento prometedor, ataluren, ahora conocido como Translarna (anteriormente conocido como PTC 124), actualmente en ensayos clínicos de fase III, para la fibrosis quística, y aprobado condicionalmente en la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para la distrofia muscular de Duchenne. Presumiblemente, ataluren se une al sitio ribosómico A, causando cambios conformacionales que permiten un mal emparejamiento entre el codón de ARNm y el anticodón de ARNt, lo que da como resultado la incorporación de un aminoácido en un PTC (6). Esta lectura ocurre mínimamente en los codones de parada normales, porque las secuencias circundantes adicionales, así como la proximidad a la cola poli A, garantizan un reconocimiento eficiente del codón de parada (6).

35 La eficacia de la lectura de PTCs por ataluren y otros agentes es relativamente baja, pero es beneficiosa en enfermedades en las que incluso niveles bajos de proteína de longitud completa son suficientes para mejorar la función celular (total o parcialmente). El resultado de este tratamiento es muy variable entre pacientes. A nivel genético, la variabilidad puede deberse en parte al contexto de identidad y secuencia del PTC (por ejemplo, UGA>UAG>UAA) (6). Sin embargo, esto no puede explicar la variabilidad observada en respuesta a los agentes de lectura entre los pacientes que participan en el mismo estudio que portan la misma mutación (5,6). Estas observaciones llevaron a sospechar que la variabilidad en un mecanismo de control de calidad, denominado degradación de ARNm con mediación sin sentido (NMD), podría influir en el resultado del tratamiento. La vía de NMD es una etapa de control de calidad durante la expresión génica que es relevante para las enfermedades genéticas porque degrada los transcritos que contienen PTC para evitar la síntesis de proteínas truncadas, potencialmente nocivas. En general, los transcritos que contienen PTCs ubicados a más de 50-55 nucleótidos en dirección 5' de la última unión exón-exón provocan NMD (4). El ajuste del pre-ARNm es un prerrequisito para la NMD. Este es el caso porque, concomitante o inmediatamente después de ajustar dos exones, se deposita un complejo de proteínas, denominado complejo de la unión de exones (EJC), en dirección 5' (por ejemplo, de 40 alrededor de 20 a alrededor de 24 nucleótidos) de cada unión exón-exón (11) El EJC consta de cuatro componentes principales, las proteínas de anclaje eIF4A3, Y14, Magoh y MLN51, y proteínas asociadas que están involucradas en la exportación del ARNm (11). El tetrámero central facilita el reclutamiento de los dos primeros factores de la NMD, UPF3B y UPF2. Posteriormente, durante una ronda de traducción pionera, cuando un ribosoma encuentra un codón de 50 parada en dirección 5' de un EJC, se recluta el tercer factor clave de la NMD, UPF1, al transcrito a través de la interacción con UPF2, marcando el transcrito para la degradación (13). De este modo, se presume que la presencia de un EJC en dirección 3' distingue un PTC de un codón de parada normal, señalando así (marcándolo) para la NMD.

55 La eficiencia con la que NMD degrada los transcritos que contienen PTC es variable. Esta variabilidad se ha observado no solo para diferentes mutaciones, sino también para la misma mutación en diferentes tipos de células, o entre pacientes (5,6,14). La eficiencia de NMD puede tener un efecto directo en la respuesta a las terapias de lectura, al menos en parte debido a que la disponibilidad de los transcritos que contienen PTC es clave para el éxito de ataluren y otros agentes de lectura, tales como los antibióticos aminoglicósidos. Esto se demostró mediante estudios en los que la NMD se inhibió al suprimir UPF1 o al administrar NMD1-1, un compuesto que atenúa la NMD

globalmente, lo que mejoró drásticamente la eficiencia del fármaco de lectura gentamicina (5, 15). Sin embargo, la supresión de UPF1 o la aplicación de la NMD en pacientes no es un enfoque viable, ya que afectaría globalmente a la NMD y sería perjudicial para la salud de los pacientes. Además, se han identificado varios agentes farmacológicos que inhiben la NMD, incluyendo cicloheximida, emetina, puromicina y pateamina A (16). Sin embargo, estos medicamentos no son candidatos ideales para uso terapéutico como inhibidores de la NMD, inhiben globalmente la NMD y generalmente son tóxicos.

El trabajo descrito en el presente documento se refiere, en parte, a la tecnología antisentido útil para abolir o inhibir la NMD de una manera específica de un gen, lo que evita de este modo problemas relacionados con la inhibición global de NMD. Como se describe en el presente documento, la unión de oligonucleótidos antisentido (ASOs, por ejemplo ASOs uniformes modificados con 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) fosforotioato) a los transcritos que contienen PTCs interfiere con el depósito de EJC en las uniones exón-exón en dirección 3' de los PTCs, eliminando así los hitos que distinguen a los PTCs, e inhibiendo la NMD de una manera específica de un gen. La inhibición de NMD aumenta la disponibilidad de transcritos que contienen PTC, lo que aumenta la eficacia de los fármacos de lectura, porque hay más moléculas de transcritos que contienen PTC sobre las cuales pueden actuar los fármacos. Esto da como resultado la producción de más proteína de longitud completa que la que ocurriría en ausencia de la inhibición de la NMD. Además, la inhibición de la NMD de una manera específica de un gen es beneficiosa para pacientes con mutaciones terminadoras que dan como resultado la producción de una proteína truncada que retiene la función normal o parcial (17). Promover la estabilización del ARNm, y por lo tanto la traducción de una proteína truncada por inhibición de NMD (sin cotratamiento con un fármaco de lectura), podría mejorar significativamente el resultado de una enfermedad.

#### Enfermedades

Cualquier mutación terminadora que ocurra en dirección 3' del primer exón y al menos 50-55 nucleótidos en dirección 5' de la última unión exón-exón puede tratarse mediante la metodología y las composiciones proporcionadas en el presente documento. Las mutaciones que siguen esta regla se denominan mutaciones "tratables". El depósito de EJC está bloqueado en al menos una unión exón-exón y, en algunos casos, en más de una unión exón-exón en dirección 3' de un PTC, simultáneamente, para proporcionar una inhibición mejorada de la NMD. La gran mayoría de los genes en el genoma humano tienen al menos dos exones (el número promedio de exones por gen en el genoma humano es aproximadamente ocho), lo que significa que las mutaciones terminadoras en muchos genes asociados con enfermedades son mutaciones tratables que pueden ser atacadas por la metodología descrita.

En algunos casos, las composiciones y la metodología son útiles para inhibir la NMD de transcritos derivados de un gen asociado a enfermedad, tales como *CFTR*, *DMD*, *HBB*, *MECP2* e *IDUA*. Las mutaciones en estos genes causan, respectivamente, fibrosis quística (1/2500 nacimientos vivos), distrofia muscular de Duchenne/Becker (1/4000 nacimientos vivos masculinos),  $\beta$ -talasemia (1/158-1/25.000 nacimientos vivos), síndrome de Rett (1/10.000-15.000 nacimientos vivos femeninos), y mucopolisacaridosis tipo 1 - Hurler (1/100.000). Un subconjunto de mutaciones terminadoras que causan estas enfermedades ha sido objeto de fármacos de lectura (3, 15, 17, 20, 22). La Tabla 1 proporciona ejemplos de mutaciones terminadoras candidatas en cada uno de los cinco genes (de la base de datos de mutaciones genéticas humanas, [www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)) que son "tratables" en base a las características mencionadas anteriormente.

Tabla 1. Lista de mutaciones terminadoras tratables para el síndrome de Rett (mutaciones en *MECP2*), fibrosis quística (y en algunos casos, ausencia bilateral congénita del conducto deferente (CBAVD), asociada con fibrosis quística) (mutaciones en *CFTR*),  $\beta$ -talasemia (mutaciones en *HBB*), distrofia muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD, distrofinopatía) (mutaciones en *DMD*), y mucopolisacaridosis tipo 1 - Hurler (mutación en *IDUA*).

Número de acceso	Cambio de codón	Cambio de aminoácido	Codón	Enfermedad
CM060329	gGAA-TAA	Glu-Ter	10	Síndrome de Rett
CM023409	cCAG-TAG	Gln-Ter	16	Síndrome de Rett
HM971529	cCAG-TAG	Gln-Ter	19	Síndrome de Rett
CM010332	cAAG-TAG	Lys-Ter	22	Síndrome de Rett
CM057720	gCAG-TAG	Gln-Ter	47	Síndrome de Rett
CM010333	TCA-TAA	Ser-Ter	49	Síndrome de Rett
CM035705	TCA-TGA	Ser-Ter	65	Síndrome de Rett
CM055984	TCA-TGA	Ser-Ter	68	Síndrome de Rett

ES 2 779 302 T3

Número de acceso	Cambio de codón	Cambio de aminoácido	Codón	Enfermedad
CM076290	TGG-TAG	Trp-Ter	104	Síndrome de Rett
CM960290	TTA-TAA	Leu-Ter	1254	Fibrosis quística
CM920186	TCA-TAA	Ser-Ter	1255	Fibrosis quística
CM993870	TGGg-TGA	Trp-Ter	1274	Fibrosis quística
CM970297	aCAG-TAG	Gln-Ter	1281	Fibrosis quística
CM900061	TGGa-TGA	Trp-Ter	1282	Fibrosis quística
CM003260	aCAG-TAG	Gln-Ter	1291	Fibrosis quística
CM993871	TATg-TAA	Tyr-Ter	1307	Fibrosis quística
CM972963	tGAA-TAA	Glu-Ter	1308	Fibrosis quística
CM920192	TGG-TAG	Trp-Ter	1310	Fibrosis quística
CM930137	tCAA-TAA	Gln-Ter	1313	Fibrosis quística
CM900062	TGG-TAG	Trp-Ter	1316	Fibrosis quística
CM920194	tGAA-TAA	Glu-Ter	1371	Fibrosis quística
CM024696	TACc-TAA	Tyr-Ter	1381	Fibrosis quística
CM983581	cCAA-TAA	Gln-Ter	1382	Fibrosis quística
CM983582	tGAA-TAA	Glu-Ter	1401	Fibrosis quística
CM931253	cCAA-TAA	Gln-Ter	1411	CBAVD
CM960291	aCAA-TAA	Gln-Ter	1412	Fibrosis quística
CM810001	cCAG- TAG	Gln-Ter	39	β-talasemia
CM880039	tGAG-TAG	Glu-Ter	43	β-talasemia
CM034660	tAAG-TAG	Lys-Ter	59	β-talasemia
CM880040	qAAG-TAG	Lys-Ter	61	β-talasemia
CM900122	tGAG-TAG	Glu-Ter	90	β-talasemia
CM054661	TTA-TAA	Leu-Ter	3471	BMD
CM960494	cCAG- TAG	Gln-Ter	3493	BMD
CM040028	gGAA-TAA	Glu-Ter	3515	BMD
CM084901	aGAA-TAA	Glu-Ter	3516	BMD
CM043277	tCAG-TAG	Gln-Ter	3625	Distrofinopatía
CM950349	tCAA-TAA	Gln-Ter	3635	DMD
CM070908	TCG-TAG	Ser-Ter	3637	BMD
CM022961	aGAG-TAG	Glu-Ter	3657	DMD
CM920372	TGG-TAG	Trp-Ter	402	MPSI-H

Cualquier enfermedad asociada con un alelo sin sentido puede tratarse usando las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento. Otras enfermedades o trastornos que también son tratables usando las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, síndrome de Shwachman-Diamond, síndrome de Usher, ataxia telangiectasia, hemofilia A y B, enfermedad de Hailey-Hailey, enfermedad de Ullrich, acidemia metilmalónica, deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa 1A, trastornos de la biogénesis del peroxisoma, distrofia muscular de la cintura y extremidades, condrodisplasia metafisaria de Schmid, enfermedad de Sandhoff, síndrome de Marfan, anemia, epidermólisis ampollosa simple, enfermedad de Tay-Sachs, deficiencia de triosa fosfato isomerasa, enfermedad de Alzheimer, síndrome de QT largo, resistencia a insulina, enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce, intolerancia hereditaria a la fructosa, inmunodeficiencia combinada severa ligada al cromosoma X, cánceres hereditarios tales como los debidos a mutaciones terminadoras de *BRCA1*, trastornos del metabolismo de hidratos de carbono, trastornos del metabolismo de aminoácidos, trastornos del metabolismo de lipoproteínas, trastornos del metabolismo de lípidos, trastornos del metabolismo de enzimas lisosomales, trastornos del metabolismo de esteroides, trastornos del metabolismo de purina, trastornos del metabolismo de pirimidina, trastornos del metabolismo de metales, trastornos del metabolismo de porfirina, y trastornos del metabolismo del grupo hemo.

### ASOs

Un aspecto de la presente descripción es una composición que comprende ácidos nucleicos y/o análogos de ácidos nucleicos, tales como polinucleótidos, que inhiben la degradación de ARNm con mediación sin sentido (NMD) de una manera específica de un gen. Los ácidos nucleicos o polinucleótidos son típicamente oligonucleótidos antisentido (ASOs) que se unen a una región específica de un transcrito de ARNm e interfieren con la unión de uno o más componentes del complejo de la unión de exones (EJC). En todas las realizaciones del presente documento, la referencia a “un ARNm” o “el ARNm” significa una o más (al menos una) moléculas de ARNm. Como se usa en el presente documento, las expresiones “oligonucleótido antisentido”, “ASO” y “oligómero antisentido” se usan indistintamente, y se refieren a un polinucleótido, que comprende nucleótidos, que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, ARNm) mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick o emparejamiento de bases oscilante (GU). El ASO puede tener una complementariedad de secuencia exacta con la secuencia diana o casi complementariedad (por ejemplo, complementariedad suficiente para unirse a la secuencia diana e inhibir la unión de uno o más componentes del EJC). Tales ASOs bloquean o inhiben la unión o depósito de uno o más componentes del EJC a un ARNm, y lo hacen de una manera específica de un gen; Los ASOs están diseñados de forma que se unan (hibriden) a un ácido nucleico diana (por ejemplo, un transcrito de ARNm) y permanezcan hibridados en condiciones fisiológicas. Por lo general, si se hibridan con un sitio que no sea la secuencia de ácido nucleico (diana) prevista, se hibridan con un número limitado de secuencias que no son un ácido nucleico diana (con unos pocos sitios que no sean un ácido nucleico diana). El diseño de un ASO puede tener en cuenta la aparición de la secuencia de ácido nucleico diana o una secuencia de ácido nucleico suficientemente similar en otros lugares en el genoma o ARNm/transcriptoma celular, de modo que la probabilidad de que el ASO se una a otros sitios y cause efectos “fuera de la diana” es limitado.

En algunos casos, los ASOs “se hibridan específicamente” o son “específicos” para un ácido nucleico diana. Típicamente, dicha hibridación ocurre con una  $T_m$  sustancialmente mayor que 37°C, preferiblemente al menos 50°C, y típicamente entre 60°C y aproximadamente 90°C. Dicha hibridación corresponde preferiblemente a condiciones de hibridación rigurosas. A una fuerza iónica y pH dados, la  $T_m$  es la temperatura a la que el 50% de una secuencia diana se hibrida con un oligonucleótido complementario.

Los polinucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos, ASOs, ARNm, etc.) son “complementarios” entre sí cuando se produce la hibridación en una configuración antiparalela entre dos polinucleótidos monocatenarios. Un polinucleótido bicatenario puede ser “complementario” a otro polinucleótido si puede producirse hibridación entre una de las cadenas del primer polinucleótido y el segundo. La complementariedad (el grado en el que un polinucleótido es complementario con otro) es cuantificable en términos de la proporción (por ejemplo, el porcentaje) de bases en hebras opuestas que se espera que formen enlaces de hidrógeno entre sí, de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases generalmente aceptadas. La secuencia de un compuesto oligomérico, por ejemplo un ASO, no necesita ser 100% complementaria a la de su ácido nucleico diana para hibridarse. En ciertos casos, los ASOs pueden comprender al menos alrededor de 70%, al menos alrededor de 80%, al menos alrededor de 90%, al menos alrededor de 95%, o al menos alrededor de 99% de complementariedad de secuencia a una región diana dentro de la secuencia de ácido nucleico diana a la que están dirigidos. Por ejemplo, un ASO en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto oligomérico son complementarias a una región diana, y por lo tanto se hibridarían específicamente, representaría un 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes se pueden agrupar o intercalar con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o con nucleobases complementarias. Un ASO que tiene 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de completa complementariedad con el ácido nucleico diana tendría 77,8% de complementariedad global con el ácido nucleico diana, y de este modo estaría dentro de este alcance. El porcentaje de complementariedad de un ASO con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse habitualmente usando programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineación local) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, *Genome Res.*, 1997, 7, 649-656).



Un ASO no necesita hibridarse con todas las nucleobases en una secuencia diana, y las nucleobases con las que hibrida pueden ser contiguas o no contiguas. Los ASOs pueden hibridarse sobre uno o más segmentos de un ácido nucleico diana, de modo que los segmentos intermedios o adyacentes no estén involucrados en el evento de hibridación (por ejemplo, se puede formar una estructura de bucle o una estructura de horquilla). En ciertos casos, un ASO se hibrida con nucleobases no contiguas en un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un ASO puede hibridarse con nucleobases en un ácido nucleico diana que están separados por una o más nucleobases a las que el ASO no se hibrida.

Los ASOs son polinucleótidos hechos de nucleótidos que comprenden una nucleobase que puede ser capaz de hibridarse con una nucleobase complementaria presente en un ARNm diana, un resto de azúcar y un esqueleto que conecta los monómeros. El término ASO también incorpora cualquier molécula oligomérica que comprenda nucleobases capaces de hibridarse con una nucleobase complementaria en un ARNm diana pero no comprende un resto de azúcar, tal como un ácido nucleico peptídico (PNA). Los ASOs pueden comprender nucleótidos naturales, análogos de nucleótidos, nucleótidos modificados, o cualquier combinación de dos o tres de los anteriores. La expresión "nucleótidos de origen natural" incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión "nucleótidos modificados" incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y/o que tienen un esqueleto modificado. Las modificaciones químicas de los ASOs o componentes de los ASOs que son compatibles con los métodos y composiciones descritos en el presente documento serán evidentes para un experto en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente U.S. nº 8.258.109 B2, la patente U.S. nº 5.656.612, la publicación de patente U.S. nº 2012/0190728, y Dias y Stein, *Mol. Cancer Ther.* 2002, 1, 347-355.

La nucleobase de un ASO puede ser cualquier nucleobase de origen natural no modificada, tal como adenina, guanina, citosina, timina y uracilo, o cualquier nucleobase sintética o modificada que sea suficientemente similar a una nucleobase no modificada de modo que sea capaz de enlazarse mediante enlace de hidrógeno con una nucleobase presente en un ARNm diana. Los ejemplos de nucleobases modificadas incluyen, sin limitación, hipoxantina, xantina, 7-metilguanina, 5,6-dihidrouracilo, 5-metilcitosina, y 5-hidroximetilcitosina.

Cualquiera de los ASOs descritos en el presente documento puede contener un resto de azúcar que comprende ribosa o desoxirribosa, como está presente en los nucleótidos de origen natural, o un resto de azúcar modificado, que incluye restos de azúcar que contienen un anillo de morfolina. Los ejemplos no limitantes de restos de azúcar modificados incluyen sustituciones 2', tales como 2'-O-metilo (2'OMe), 2'-O-metoxietilo (2'MOE), 2'-O-aminoetilo, 2'F; N3'->P5' fosforamidato, 2'dimetilaminoxietoxi, 2'dimetilaminoxietoxi, 2'-guanidinido, 2'-O-guanidinio etilo, azúcares modificados con carbamato, y azúcares modificados bicíclicos. En algunos casos, la modificación del resto de azúcar se selecciona de 2'OMe, 2'F y 2'MOE. En algunos casos, la modificación del resto de azúcar es un enlace de puente adicional, tal como en un ácido nucleico bloqueado (LNA).

Los ASOs descritos en el presente documento también comprenden una estructura de cadena principal que conecta los componentes de un oligómero. La expresión "estructura de cadena principal" y "enlaces oligonucleotídicos" se pueden usar indistintamente, y se refieren a la conexión entre monómeros del ASO. En los oligonucleótidos de origen natural, la cadena principal comprende un enlace de fosfodiéster 3'-5' que conecta restos de azúcar del oligómero. La estructura de cadena principal o los enlaces oligonucleotídicos del ASO descrito en el presente documento pueden incluir (pero no se limitan a) fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato, fosforoimidato, y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche et al. *Nucleic Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec et al. *J. Am. Chem. Soc.* 106:6077 (1984); Stein et al. *Nucleic Acids Res.* 16:3209 (1988); Zon et al. *Anti Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon et al. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, p. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. patente U.S. nº 5.151.510; Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990). En algunos casos, la estructura de cadena principal del ASO no contiene fósforo sino que contiene enlaces peptídicos, por ejemplo en un ácido nucleico peptídico (PNA), o grupos enlazantes que incluyen carbamato, amidas, y grupos hidrocarbonados lineales y cíclicos. En algunos casos, la modificación de cadena principal es un enlace de fosfotioato.

En algunos ejemplos, cada monómero del ASO no se modifica o se modifica de la misma manera, por ejemplo cada enlace de la cadena principal del ASO comprende un enlace de fosforotioato, o cada resto de azúcar de ribosa comprende una modificación 2'O-metilo. Dichas modificaciones que están presentes en cada uno de los componentes monoméricos de un ASO se denominan "modificaciones uniformes". En algunos ejemplos, puede desearse una combinación de diferentes modificaciones, por ejemplo un ASO puede comprender una combinación de enlaces de fosforodiamidato y restos de azúcar que comprenden anillos de morfolina (morfolinos). Las combinaciones de diferentes modificaciones para un ASO se denominan "modificaciones mixtas" o "químicas mixtas".

En algunos casos, el ASO comprende una o más modificaciones de la cadena principal. En algunos casos, el ASO comprende una o más modificaciones del resto de de azúcar. En algunos casos, el ASO comprende una o más modificaciones de la cadena principal y una o más modificaciones del resto de azúcar. En algunos casos, el ASO comprende modificaciones de 2'MOE y una cadena principal de fosforotioato. En algunos casos, el ASO comprende un fosfoamidato morfolino (PMO). En algunos casos, el ASO comprende un ácido nucleico peptídico (PNA). En algunos casos, el ASO comprende una modificación de ribofuransilo o 2'desoxiribofuransilo. En algunos casos, el

ASO comprende modificaciones de 2'-O-metiloxietilo (cMOE) con restricción 2'4'. En algunos casos, el ASO comprende modificaciones de 2'-O etil BNA con restricción 2'4' cEt.

Cualquiera de los ASOs o cualquier componente de un ASO (por ejemplo, una nucleobase, un resto de azúcar, una cadena principal) descritos en el presente documento pueden modificarse a fin de lograr las propiedades o actividades deseadas del ASO, o reducir las propiedades o actividades no deseadas del ASO. Por ejemplo, un ASO o uno o más componentes de cualquier ASO pueden modificarse para mejorar la afinidad de unión a una secuencia diana en un ARNm; reducir la unión a cualquier secuencia no diana; reducir la degradación por nucleasas celulares (es decir, RNasa H); mejorar la absorción del ASO en una célula y/o en el núcleo de una célula; alterar la farmacocinética o farmacodinámica del ASO; y modular la vida media del ASO.

En algunos casos, los ASOs están compuestos por nucleótidos modificados con 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) fosforotioato. Los ASOs compuestos por tales nucleótidos son especialmente muy adecuados para los métodos descritos en el presente documento; se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen tales modificaciones tienen una resistencia significativamente mejorada a la degradación por nucleasas y una mayor biodisponibilidad, haciéndolos adecuados, por ejemplo, para el suministro oral en algunos casos descritos aquí. Véanse, por ejemplo, Geary et al., *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 296(3): 890-7; Geary et al., *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 296(3):898-904.

Los métodos para sintetizar ASOs son conocidos por un experto en la técnica. Alternativamente, o además, los ASOs pueden obtenerse de una fuente comercial.

En algunos casos, los ASOs se unen a o son específicos de (por ejemplo, se unen de manera específica a un gen) una región de un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) que está adyacente y en dirección 5' de una unión exón-exón, tal como a una región en la que un EJC está típicamente unido. A menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de ácido nucleico monocatenarias (por ejemplo, ARNm, oligonucleótido, ASO, etc.) es el extremo 5', y a la dirección izquierda de las secuencias de ácido nucleico monocatenarias o bicatenarias se hace referencia como la dirección 5'. De manera similar, el extremo o dirección derecha de una secuencia de ácido nucleico (monocatenaria o bicatenaria) es el extremo o dirección 3'. Generalmente, una región o secuencia que está 5' con respecto a un punto de referencia en un ácido nucleico se denomina "en dirección 5'", y una región o secuencia que está 3' con respecto a un punto de referencia en un ácido nucleico se denomina "en dirección 3'". Generalmente, un codón de iniciación o de inicio se encuentra cerca del extremo 5', y el codón de terminación se encuentra cerca del extremo 3'. Los nucleótidos que están en dirección 5' de un punto de referencia en un ácido nucleico pueden designarse por un número negativo; los nucleótidos que están en dirección 3' de un punto de referencia pueden designarse con un número positivo. Por ejemplo, un punto de referencia (por ejemplo, una unión exón-exón en ARNm) puede designarse como el sitio "cero", y un nucleótido que está directamente adyacente y en dirección 5' del punto de referencia se designa "menos uno", por ejemplo "-1", mientras que un nucleótido que está directamente adyacente y en dirección 3' del punto de referencia se designa "más uno", por ejemplo "+1". De este modo, en algunos aspectos, los ASOs son específicos de una región en un ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) que está 5' con respecto a una unión exón-exón en un ARNm (por ejemplo, en la dirección designada por números negativos). Por ejemplo, los ASOs son específicos de cualquier región de secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) dentro de los primeros 100 nucleótidos en dirección 5' de (5' con respecto a) una unión exón-exón (por ejemplo, específicos de una región entre alrededor de los nucleótidos -1 y -100 con respecto a la unión exón-exón). En algunos aspectos, los ASOs son específicos de una región dentro de aproximadamente los primeros 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón (específicos de una región designada -90, -80, -70, -60, -50, -40, -30, -20 o -10, con respecto a una unión exón-exón). En algunos casos, los ASOs son específicos de una región del ARNm que está entre alrededor de -6 y alrededor de -38 (con referencia a una unión exón-exón). En algunos casos con referencia a una unión exón-exón, los ASOs son específicos de una región del ARNm que está entre alrededor de -5 y alrededor de -40, alrededor de -7 y alrededor de -35, alrededor de -10 y alrededor de -30, alrededor de -15 y alrededor de -25, o alrededor de -18 y alrededor de -24. En algunos casos, el ASO es específico de una secuencia que abarca la región entre alrededor de -20 y alrededor de -24, por ejemplo la región en la que se une típicamente el EJC. Usando ensayos de protección de RNasa H, las áreas protegidas con EJC se cartografiaron *in vitro* en una región entre -20 y -24 nt en dirección 5' del extremo 3' de los exones de ensayo (23). Además, los análisis de todo el transcriptoma del depósito de EJC confirmó que la mayoría de los EJCs se depositan entre -20 y -24 nucleótidos en dirección 5' de cada unión exón-exón.

Por ejemplo, un ASO puede ser específico de una secuencia (por ejemplo, se hibrida con una secuencia diana) que se solapa total o parcialmente con una región entre -20 y -24 (con referencia a una unión exón-exón). En algunos casos, el ASO se solapa con un solo nucleótido en la región entre -20 y -24. En algunos casos, el ASO se solapa con al menos 2 nucleótidos, al menos 3 nucleótidos, al menos 4 nucleótidos, o con los 5 nucleótidos o más en la región entre -20 y -24.

Los ASOs pueden tener cualquier longitud adecuada para la unión específica y la inhibición eficaz de la unión o depósito de EJC. Por ejemplo, el ASO puede tener 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más nucleótidos de longitud. En algunos casos, el ASO tiene entre alrededor de 10 y alrededor de 30, alrededor de 10 y alrededor de 20, o alrededor de 15 nucleótidos de longitud. Generalmente, el ASO está diseñado para unirse a una región en dirección 5' de una unión exón-exón y tener una cierta longitud para bloquear específicamente la unión o depósito de

EJC pero no interferir con el ajuste del ARNm. En algunos casos, dos o más ASOs se diseñan y se usan para bloquear la unión o depósito de EJC en dirección 5' de una o más uniones exón-exón.

En algunos casos, el ASO se une a una región en dirección 5' de una unión exón-exón que se encuentra en dirección 3' de (3' con respecto a) un codón de terminación prematura (PTC), tal como un PTC que resulta de una mutación terminadora en un gen particular o ARNm. En algunos casos, el PTC es un PTC de origen natural, por ejemplo el PTC no resulta de una mutación. En algunos ejemplos, la región a la que se dirige el ASO está en dirección 5' de la primera unión exón-exón que está en dirección 3' del PTC. En otros ejemplos, las regiones en dirección 5' de una o más otras uniones exón-exón también están se seleccionan como dianas (por ejemplo, siempre que estén en dirección 3' del PTC). En un caso, la región que se selecciona como diana es la región que, si está unida por el ASO, se produce la inhibición o el bloqueo de uno o más componentes del EJC, y la región que, cuando de lo contrario está unida por el EJC, marca o señala el ARNm para ser degradado por NMD. En otro caso, la región que se selecciona como diana para bloquear el depósito del EJC (al bloquear la unión o la formación del EJC) es adyacente a la región que de otra modo estaría unida por el EJC. De este modo, por ejemplo, y sin estar atados por ningún mecanismo en particular, la unión o hibridación de un ASO a un ARNm desplaza, bloquea o impide de otro modo que el EJC se una o se forme en el ARNm de manera funcional (por ejemplo, en una región que se encuentra en dirección 3' de un PTC y en dirección 5' de una unión exón-exón), lo que da como resultado la inhibición de la NMD del ARNm.

En algunos casos, el ácido nucleico al que se dirige un ASO es un transcrito de ARNm expresado en una célula, tal como una célula eucariota. Como se describe en el presente documento, el ARNm contiene una mutación terminadora, que da como resultado un PTC. Típicamente, los ARNm con PTCs son dianas de NMD. En algunos casos, la mutación terminadora es una mutación que causa una enfermedad (tal como una mutación descrita aquí que causa una enfermedad). La enfermedad puede ser causada por el recambio rápido (por ejemplo, por NMD) del ARNm, una falta o producción reducida de proteína funcional debido a un producto proteico truncado, niveles insuficientes de un producto proteico truncado que tiene una función normal o parcial, o combinaciones de los mismos.

Por "mutación" se entiende que un ácido nucleico particular (por ejemplo, un gen, transcrito expresado a partir de dicho gen) difiere en uno o más nucleótidos de una secuencia nucleotídica de tipo salvaje y codifica una o más sustituciones, adiciones o, en algunos casos, supresiones o truncamientos de aminoácidos, en la proteína expresada a partir de ella. Las mutaciones incluyen, pero no se limitan a, mutaciones puntuales (que afectan a un solo nucleótido), sustituciones, inserciones, supresiones (incluyendo truncamientos) de nucleótidos, o combinaciones de los mismos. Las "mutaciones terminadoras" incluyen cualquier mutación que da como resultado la introducción (prematura) de un codón de parada (terminación) en dirección 5' del codón de parada normal. Las mutaciones terminadoras, en algunos aspectos, causan y, de este modo, se denominan indistintamente "codones de terminación prematura" (PTCs). En algunos aspectos, los PTCs comprenden una secuencia nucleotídica triplete, por ejemplo UGA (por ejemplo, TGA en ADN), UAG (por ejemplo, TAG en ADN), o UAA (por ejemplo, TAA en ADN). Por ejemplo, las mutaciones (por ejemplo, en ADN, ARNm (ARN), o en ambos) que dan como resultado un PTC incluyen, pero no se limitan a: (1) sustituciones de un solo par de bases que cambian un codón codificante a un PTC en el marco (por ejemplo, mutaciones terminadoras); (2) mutaciones de inserción o supresión que alteran el marco de lectura ribosómico, causando que los ribosomas traductores se encuentren con un PTC; (3) una mutación de inserción que mantiene el marco de lectura distal adecuado pero introduce un PTC dentro del marco; y (4) mutaciones que conducen a defectos de ajuste del ARNm que causan la retención de un intrón (o parte de un intrón) que altera el marco de lectura, lo que lleva a los ribosomas traductores a encontrar un PTC. En algunos aspectos, las mutaciones que dan como resultado un PTC tienen consecuencias importantes sobre la expresión génica, tal como en el contexto de la enfermedad. Por ejemplo, un PTC terminará la traducción de ARNm antes de completar un polipéptido de longitud completa, lo que conducirá a la producción de proteínas truncadas que a menudo son no funcionales y/o inestables y/o tienen una función perjudicial. Además, los ARNm que contienen PTCs también son frecuentemente inestables porque los ARNm son degradados por NMD, lo que da como resultado una reducción grave en los niveles de ARNm en estado estacionario. En algunos ejemplos, la combinación de estos eventos inducidos por PTC reduce el nivel de proteína funcional producida hasta tal punto que resulta un estado de enfermedad grave.

La siguiente es una lista no limitante de secuencias de ASOs para inhibir la NMD del ARNm transcrito a partir de un alelo *HBB* que contiene una mutación terminadora (por ejemplo, CM810001, CM880039, CM034660, CM880040, y CM900122), por ejemplo en el tratamiento de la  $\beta$ -talasemia:

GCAGCTTGTACAGT (SEQ ID NO:1);	TGCAGCTTGTACAG (SEQ ID NO:2);
GTGCAGCTTGTACA (SEQ ID NO: 3);	CGTGCAGCTTGTAC (SEQ ID NO:4);
ACGTGCAGCTTGTCA (SEQ ID NO:5);	CACGTGCAGCTTGT (SEQ ID NO:6);
CCACGTGCAGCTTGT (SEQ ID NO:7);	TCCACGTGCAGCTT (SEQ ID NO:8);

ES 2 779 302 T3

ATCCACGTGCAGCTT (SEQ ID NO:9);	GATCCACGTGCAGCT (SEQ ID NO:10);
GGATCCACGTGCAGC (SEQ ID NO:11);	AGGATCCACGTGCAG (SEQ ID NO:12);
CAGGATCCACGTGCA (SEQ ID NO:13);	TCAGGATCCACGTGC (SEQ ID NO:14);
CTCAGGATCCACGTG (SEQ ID NO:15);	TCTCAGGATCCACGT (SEQ ID NO:16);
TTCTCAGGATCCACG (SEQ ID NO:17);	GTTCTCAGGATCCAC (SEQ ID NO:18);
AGTTCTCAGGATCCA (SEQ ID NO:19).	

La siguiente es una lista no limitante de secuencias de ASOs para inhibir la NMD del ARNm transcrito a partir de un alelo *MECP2* que contiene una mutación terminadora (por ejemplo, CM060329, CM023409, HM971529, CM010332, CM057720, CM010333, CM035705, CM055984, y CM076290), por ejemplo en el tratamiento del síndrome de Rett:

CCCAGCAGAGCGGCC (SEQ ID NO:20);	TCCCAGCAGAGCGGC (SEQ ID NO:21);
TTCCCAGCAGAGCGG (SEQ ID NO:22);	CTTCCCAGCAGAGCG (SEQ ID NO:23);
ACTTCCCAGCAGAGC (SEQ ID NO:24);	TACTTCCCAGCAGAG (SEQ ID NO:25);
ATACTTCCCAGCAGA (SEQ ID NO:26);	CATACTTCCCAGCAG (SEQ ID NO:27);
TCATACTTCCCAGCA (SEQ ID NO:28);	ATCATACTTCCCAGC (SEQ ID NO:29);
CATCATACTTCCCAG (SEQ ID NO:30);	ACATCATACTTCCCA (SEQ ID NO:31);
CACATCATACTTCCC (SEQ ID NO:32);	ACACATCATACTTCC (SEQ ID NO:33);
TACACATCATACTTC (SEQ ID NO:34);	ATACACATCATACTT (SEQ ID NO:35);
AATACACATCATACT (SEQ ID NO:36);	AAATACACATCATACT (SEQ ID NO:37);
CAAATACACATCATA (SEQ ID NO:38).	

5

La siguiente es una lista no limitante de secuencias de ASOs para inhibir la NMD del ARNm transcrito a partir de un alelo *CFTR* que contiene una mutación terminadora (por ejemplo, CM960290, CM920186, CM993870, CM970297, CM900061, CM003260, CM993871, CM972963, CM920192, CM930137, CM900062, CM920194, CM024696, CM983581, CM983582, CM931253, y CM960291), por ejemplo en el tratamiento de la fibrosis quística y/o CBAVD:

10 ASOs que se dirigen al exón 23

TCCTCCACTGTTGCA (SEQ ID NO:39);	TTCCTCCACTGTTGC (SEQ ID NO:40);
TTTCTCCACTGTTG (SEQ ID NO:41);	CTTCTCCACTGTT (SEQ ID NO:42);
GCTTCTCCACTGT (SEQ ID NO:43);	GGCTTCTCCACTG (SEQ ID NO:44);
AGGCTTCTCCACT (SEQ ID NO:45);	AAGGCTTCTCCAC (SEQ ID NO:46);
AAAGGCTTCTCCA (SEQ ID NO:47);	CAAAGGCTTCTCC (SEQ ID NO:48);
CCAAAGGCTTCTC (SEQ ID NO:49);	TCCAAAGGCTTCTC (SEQ ID NO:50);
CTCCAAAGGCTTCC (SEQ ID NO:51);	ACTCCAAAGGCTTCC (SEQ ID NO:52);
CACTCCAAAGGCTT (SEQ ID NO:53);	TCACTCCAAAGGCTT (SEQ ID NO:54);
ATCACTCCAAAGGCT (SEQ ID NO:55);	TATCACTCCAAAGGC (SEQ ID NO:56);
GTACTCACTCCAAAGG (SEQ ID NO:57).	

ASOs que se dirigen al exón 24

ES 2 779 302 T3

CTTGATCACTCCACT (SEQ ID NO:58);	TCTTGATCACTCCAC (SEQ ID NO:59);
TTCTTGATCACTCCA (SEQ ID NO:60);	TTTCTTGATCACTCC (SEQ ID NO:61);
ATTTCTTGATCACTC (SEQ ID NO:62);	TATTTCTTGATCACT (SEQ ID NO:63);
ATATTTCTTGATCAC (SEQ ID NO:64);	CATATTTCTTGATCA (SEQ ID NO:65);
CCATATTTCTTGATC (SEQ ID NO:66);	TCCATATTTCTTGAT (SEQ ID NO:67);
TTCCATATTTCTTGA (SEQ ID NO:68);	TTTCCATATTTCTTG (SEQ ID NO:69);
CTTTCCATATTTCTT (SEQ ID NO:70);	ACTTTCCATATTTCT (SEQ ID NO:71);
AACTTTCCATATTTT (SEQ ID NO:72);	CAACTTTCCATATTT (SEQ ID NO:73);
GCAACTTTCCATATT (SEQ ID NO:74);	TGCAACTTTCCATAT (SEQ ID NO:75);
CTGCAACTTTCCATA (SEQ ID NO:76).	

ASOs que se dirigen al exón 25

TTCATCAAGCAGCAA (SEQ ID NO:77);	GTTTTCATCAAGCAGCA (SEQ ID NO:78);
GGTTCATCAAGCAGC (SEQ ID NO:79);	GGGTTCATCAAGCAG (SEQ ID NO:80);
TGGGTTCATCAAGCA (SEQ ID NO:81);	CTGGGTTCATCAAGC (SEQ ID NO:82);
ACTGGGTTCATCAAG (SEQ ID NO:83);	CACTGGGTTCATCAA (SEQ ID NO:84);
GCACTGGGTTCATCA (SEQ ID NO:85);	AGCACTGGGTTCATC (SEQ ID NO:86);
GAGCACTGGGTTCAT (SEQ ID NO:87);	TGAGCACTGGGTTC (SEQ ID NO:88);
ATGAGCACTGGGTTC (SEQ ID NO:89);	AATGAGCACTGGGT (SEQ ID NO:90);
AAATGAGCACTGGGT (SEQ ID NO:91);	CAAATGAGCACTGGG (SEQ ID NO:92)
CCAAATGAGCACTGG (SEQ ID NO:93);	TCCAAATGAGCACTG (SEQ ID NO:94);
ATCCAAATGAGCACT (SEQ ID NO:95).	

ASOs que se dirigen al exón 26

TTGCTTCTATCCTGT (SEQ ID NO:96);	ATTGCTTCTATCCTG (SEQ ID NO:97);
CATTGCTTCTATCCT (SEQ ID NO:98);	GCATTGCTTCTATCC (SEQ ID NO:99);
AGCATTGCTTCTATC (SEQ ID NO:100);	CAGCATTGCTTCTAT (SEQ ID NO:101);
CCAGCATTGCTTCTA (SEQ ID NO:102);	TCCAGCATTGCTTCT (SEQ ID NO:103);
TTCCAGCATTGCTTC (SEQ ID NO:104);	ATTCCAGCATTGCTT (SEQ ID NO:105);
CATTCCAGCATTGCT (SEQ ID NO:106);	GCATTCCAGCATTGC (SEQ ID NO:107);
GGCATTCCAGCATTG (SEQ ID NO:108);	TGGCATTCCAGCATT (SEQ ID NO:109);
TTGGCATTCCAGCAT (SEQ ID NO:110);	GTTGGCATTCCAGCA (SEQ ID NO:111);
TGTTGGCATTCCAGC (SEQ ID NO:112);	TTGTTGGCATTCCAG (SEQ ID NO:113);
ATTGTTGGCATTCCA (SEQ ID NO:114).	

## ES 2 779 302 T3

La siguiente es una lista no limitante de secuencias de ASOs para inhibir la NMD del ARNm transcrito a partir de un alelo *DMD* que contiene una mutación terminadora (por ejemplo, CM054661, CM960494, CM040028, CM084901, CM043277, CM950349, CM070908, y CM022961), por ejemplo en tratamiento de DMD/BMD:

ASOs que se dirigen al exón 74

TAGGATTCTCTCTAG (SEQ ID NO:115);	CTAGGATTCTCTCTA (SEQ ID NO:116);
GCTAGGATTCTCTCT (SEQ ID NO:117);	TGCTAGGATTCTCTC (SEQ ID NO:118);
CTGCTAGGATTCTCT (SEQ ID NO:119);	TCTGCTAGGATTCTC (SEQ ID NO:120);
ATCTGCTAGGATTCT (SEQ ID NO:121);	GATCTGCTAGGATTC (SEQ ID NO:122);
AGATCTGCTAGGATT (SEQ ID NO:123);	AAGATCTGCTAGGAT (SEQ ID NO:124);
CAAGATCTGCTAGGA (SEQ ID NO:125);	TCAAGATCTGCTAGG (SEQ ID NO:126);
CTCAAGATCTGCTAG (SEQ ID NO:127);	CCTCAAGATCTGCTA (SEQ ID NO:128);
TCCTCAAGATCTGCT (SEQ ID NO:129);	TTCCTCAAGATCTGC (SEQ ID NO:130);
CTTCTCAAGATCTG (SEQ ID NO:131);	TCTTCTCAAGATCT (SEQ ID NO:132);
TTCTTCTCAAGATC (SEQ ID NO:133).	

ASOs que se dirigen al exón 75

TGTGTAAGTGTGACT (SEQ ID NO:134);	CTGTGTAAGTGTGAC (SEQ ID NO:135);
CCTGTGTAAGTGTGA (SEQ ID NO:136);	GCCTGTGTAAGTGTG (SEQ ID NO:137);
AGCCTGTGTAAGTGT (SEQ ID NO:138);	TAGCCTGTGTAAGTGT (SEQ ID NO:139);
TTAGCCTGTGTAAGT (SEQ ID NO:140);	CTTAGCCTGTGTAAG (SEQ ID NO:141);
CCTTAGCCTGTGTAA (SEQ ID NO:142);	GCCTTAGCCTGTGTAA (SEQ ID NO:143);
TGCCTTAGCCTGTGT (SEQ ID NO:144);	CTGCCTTAGCCTGTG (SEQ ID NO:145);
GCTGCCTTAGCCTGT (SEQ ID NO:146);	AGCTGCCTTAGCCTG (SEQ ID NO:147);
CAGCTGCCTTAGCCT (SEQ ID NO:148);	GCAGCTGCCTTAGCC (SEQ ID NO:149);
AGCAGCTGCCTTAGC (SEQ ID NO:150);	CAGCAGCTGCCTTAG (SEQ ID NO:151);
CCAGCAGCTGCCTTA (SEQ ID NO:152).	

ASOs que se dirigen al exón 76

CCAACCACTCGGAGC (SEQ ID NO:153);	GCCAACCACTCGGAG (SEQ ID NO:154);
TGCCAACCACTCGGA (SEQ ID NO:155);	CTGCCAACCACTCGG (SEQ ID NO:156);
ACTGCCAACCACTCG (SEQ ID NO:157);	GACTGCCAACCACTC (SEQ ID NO:158);
TGACTGCCAACCACT (SEQ ID NO:159);	TTGACTGCCAACCACT (SEQ ID NO:160);
TTTACTGCCAACCA (SEQ ID NO:161);	GTTTACTGCCAACCA (SEQ ID NO:162);
AGTTTACTGCCAAC (SEQ ID NO:163);	AAGTTTACTGCCAAC (SEQ ID NO:164);
GAAGTTTACTGCCA (SEQ ID NO:165);	CGAAGTTTACTGCCA (SEQ ID NO:166);
CCGAAGTTTACTGC (SEQ ID NO:167);	TCCGAAGTTTACTGC (SEQ ID NO:168);

ES 2 779 302 T3

GTCCGAAGTTTGACT (SEQ ID NO:169);	AGTCCGAAGTTTGAC (SEQ ID NO:170);
GAGTCCGAAGTTTGA (SEQ ID NO:171).	

ASOs que se dirigen al exón 77

TTGAGTTGCTCCATC (SEQ ID NO:172);	GTTGAGTTGCTCCAT (SEQ ID NO:173);
TGTTGAGTTGCTCCA (SEQ ID NO:174);	TTGTTGAGTTGCTCC (SEQ ID NO:175);
GTTGTTGAGTTGCTC (SEQ ID NO:176);	AGTTGTTGAGTTGCT (SEQ ID NO:177);
GAGTTGTTGAGTTGC (SEQ ID NO:178);	GGAGTTGTTGAGTTG (SEQ ID NO:179);
AGGAGTTGTTGAGTT (SEQ ID NO: 180);	AAGGAGTTGTTGAGT (SEQ ID NO:181);
GAAGGAGTTGTTGAG (SEQ ID NO:182);	GGAAGGAGTTGTTGA (SEQ ID NO:183);
GGGAAGGAGTTGTTG (SEQ ID NO:184);	AGGGAAGGAGTTGTT (SEQ ID NO:185);
TAGGGAAGGAGTTGT (SEQ ID NO:186);	CTAGGGAAGGAGTTG (SEQ ID NO:187);
ACTAGGGAAGGAGTT (SEQ ID NO:188);	AACTAGGGAAGGAGT (SEQ ID NO:189);
GAAGTGGGAAGGAG (SEQ ID NO:190).	

La siguiente es una lista no limitante de secuencias de ASOs para inhibir la NMD del ARNm transcrito a partir de un alelo *IDUA* que contiene una mutación terminadora (por ejemplo, CM920372), por ejemplo en el tratamiento de MPS1-H:

5

ASOs que se dirigen al exón 9 AGCCGCAGGGTCACC (SEQ ID NO:191); CAGCCGCAGGGTCAC (SEQ ID NO:192); GCAGCCGCAGGGTCA (SEQ ID NO:193); CGCAGCCGCAGGGTC (SEQ ID NO:194); GCGCAGCCGCAGGGT (SEQ ID NO:195); CGCGCAGCCGCAGGG (SEQ ID NO:196); CCGCGCAGCCGCAGG (SEQ ID NO:197); CCCGCGCAGCCGCAG (SEQ ID NO:198); CCCC GCAGCCGCA (SEQ ID NO:199); ACCCGCGCAGCCGC (SEQ ID NO:200); CACCCGCGCAGCCG (SEQ ID NO:201); GCACCCGCGCAGCC (SEQ ID NO:202); GGCACCCGCGCAGC (SEQ ID NO:203); GGGCACCCGCGCAG (SEQ ID NO:204)

10

ASOs que se dirigen al exón 10 ACTGCTCTGCCGTGG (SEQ ID NO:205); AACTGCTCTGCCGTG (SEQ ID NO:206); GAACTGCTCTGCCGT (SEQ ID NO:207); GGAAGTCTCTGCCG (SEQ ID NO:208); CGGAACTGCTCTGCC (SEQ ID NO:209); CCGGAACTGCTCTGC (SEQ ID NO:210); GCCGAACTGCTCTG (SEQ ID NO:211); CGCCGAACTGCTCT (SEQ ID NO:212); GCGCCGAACTGCTC (SEQ ID NO:213); TGCGCCGAACTGCT (SEQ ID NO:214); ATGCGCCGAACTGC (SEQ ID NO:215); CATGCGCCGAACTG (SEQ ID NO:216); GCATGCGCCGAACT (SEQ ID NO:217); CGCATGCGCCGAACT (SEQ ID NO:218); GCGCATGCGCCGAA (SEQ ID NO:219); CGCGCATGCGCCGAA (SEQ ID NO:220); GCGCGCATGCGCCG (SEQ ID NO:221); CGCGCGCATGCGCCG (SEQ ID NO:222); CCGCGCGCATGCGCC (SEQ ID NO:223)

15

ASOs que se dirigen al exón 11 GCGCACACACGTGCA (SEQ ID NO:224); CGCGCACACACGTGC (SEQ ID NO:225); GCGCGCACACACGTG (SEQ ID NO:226); GCGCGCACACACGT (SEQ ID NO:227); GGGCGCGCACACACG (SEQ ID NO:228); GGGCGGCTTCTCGGG (SEQ ID NO:229); CGGGCGGCTTCTCGG (SEQ ID NO:230)

25

ASOs que se dirigen al exón 12 CCAGACCAGAACCAG (SEQ ID NO:231); ACCAGACCAGAACCA (SEQ ID NO:232); GACCAGACCAGAACC (SEQ ID NO:233); CGACCAGACCAGAAC (SEQ ID NO:234); CCGACCAGACCAGAA (SEQ ID NO:235); TCCGACCAGACCAGA (SEQ ID NO:236); ATCCGACCAGACCAG (SEQ ID NO:237); CATCCGACCAGACCA (SEQ ID NO:238); TCATCCGACCAGACC (SEQ ID NO:239); TTCATCCGACCAGAC (SEQ ID NO:240); GTTCATCCGACCAGA (SEQ ID NO:241); TGTTTCATCCGACCAG (SEQ ID NO:242); GTGTTTCATCCGACCA (SEQ ID NO:243); CGTGTTTCATCCGACC (SEQ ID NO:244); ACGTGTTTCATCCGAC (SEQ ID NO:245); CACGTGTTTCATCCGA (SEQ ID NO:246); CCACGTGTTTCATCCG (SEQ ID NO:247); CCCACGTGTTTCATCC (SEQ ID NO:248); GCCCACGTGTTTCATC (SEQ ID NO:249)

30

ASOs que se dirigen al exón 13 AAGGTCGATGGCTTC (SEQ ID NO:250); GAAGGTCGATGGCTT (SEQ ID NO:251); TGAAGGTCGATGGCT (SEQ ID NO:252); TTGAAGGTCGATGGC (SEQ ID NO:253); GTTGAAGGTCGATGG (SEQ ID NO:254); GGTTGAAGGTCGATG (SEQ ID NO:255); AGGTTGAAGGTCGAT (SEQ ID NO:256); GAGGTTGAAGGTCGA (SEQ ID NO:257); AGAGGTTGAAGGTCG (SEQ ID NO:258);

35

AAGAGGTTGAAGGTC (SEQ ID NO:259); AAAGAGGTTGAAGGT (SEQ ID NO:260); CAAAGAGGTTGAAGG (SEQ ID NO:261); ACAAAGAGGTTGAAG (SEQ ID NO:262); CACAAAGAGGTTGAA (SEQ ID NO:263); ACACAAAGAGGTTGA (SEQ ID NO:264); AACACAAAGAGGTTG (SEQ ID NO:265); GAACACAAAGAGGTT (SEQ ID NO:266); TGAACACAAAGAGGT (SEQ ID NO:267); CTGAACACAAAGAGG (SEQ ID NO:268)

5

También se describe un (al menos uno, uno o más) oligonucleótido antisentido (ASO) para uso en un método para inhibir la degradación con mediación sin sentido (NMD) de ARNm de una manera específica de un gen en una célula eucariota, en el que dicha célula eucariota comprende ARNm codificado por un ácido nucleico que contiene un codón de terminación prematura (PTC) que causa una enfermedad o un codón de terminación prematura (PTC) de origen natural, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula eucariota con dicho ASO, en el que el ASO se hibrida con una región del ARNm que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón que: (i) se encuentra en dirección 3' del PTC; y (ii) cuando está marcado por el depósito de complejos de la unión de exones (EJC), marca el ARNm para la degradación con mediación sin sentido, en condiciones en las que el ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en la unión exón-exón e inhibir la NMD del ARNm que contiene el PTC.

Además se describe un (al menos uno, uno o más) oligonucleótido antisentido (ASO) para uso en un método para inhibir el depósito de complejos de la unión de exones (EJC) de una manera específica de gen en una célula eucariota, que comprende introducir dicho ASO en el célula, en el que el ASO es específico del ARNm de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón que está: (i) en dirección 3' de un codón de terminación prematura (PTC) que causa una enfermedad o de origen natural en ARNm transcrito en el eucariota célula; y (ii) unido por el complejo de la unión de exones (EJC) que identifica el ARNm para la degradación con mediación sin sentido (NMD), con lo que el ASO bloquea la unión o depósito de EJC a la unión exón-exón.

Otro aspecto de la descripción es un (al menos uno, uno o más) oligonucleótido antisentido (ASO) para uso en un método para aumentar en una célula eucariota la producción de una proteína truncada codificada por un gen que contiene un codón de terminación prematura (PTC), comprendiendo el método introducir dicho ASO en la célula, en el que el ASO es específico de una región del ARNm que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón que está en dirección 3' de un PTC que causa una enfermedad o de origen natural en ARNm transcrito en la célula eucariota, y a la que el depósito de complejos de la unión de exones (EJC) marca el ARNm para la degradación con mediación sin sentido, con lo que el ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en dirección 5' de la unión exón-exón y inhibir la NMD de ARNm que contiene el PTC, con lo que se produce la producción de proteínas.

La descripción también se refiere a un (al menos uno, uno o más) oligonucleótidos antisentido (ASO) para uso en un método para aumentar la eficacia de un fármaco de lectura en una célula eucariota, en el que dicho ASO es específico de una región de ARNm transcrito en la célula eucariota que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón que está en dirección 3' de un codón de terminación prematura (PTC) que causa una enfermedad o de origen natural en dicho ARNm, y a la que el depósito de complejos de la unión de exones (EJC) marca el ARNm para la degradación con mediación sin sentido, con lo que el ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en la unión exón-exón e inhibir la NMD del ARNm que contiene el PTC, y se produce la producción de proteínas.

También se describe un (al menos uno, uno o más) oligonucleótido antisentido (ASO) para uso en un método de tratamiento de una enfermedad causada por una mutación que introduce un codón de terminación prematura (PTC) en un ARNm, produciendo así ARNm que contiene PTC, en el que dicho ASO inhibe la NMD del ARNm que contiene PTC.

Un aspecto adicional de la descripción es un (al menos uno, uno o más) oligonucleótido antisentido (ASO) para uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada con un codón de terminación prematura (PTC) en un sujeto, en el que dicho ASO se hibrida con un región de ARNm en dicho sujeto que está: (a) de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón ubicada en dirección 3' de dicho PTC; y (b) se marca para la degradación con mediación sin sentido por depósito de complejos de la unión de exones (EJC). Según uno de estos usos, el ASO puede inhibir el depósito de dicho EJC. En otros aspectos de la descripción, el ASO inhibe la NMD del ARNm que contiene PTC en el sujeto, o el ASO aumenta la cantidad de una proteína truncada codificada por un gen que contiene dicho PTC. En cualquiera de las aplicaciones que implican el uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con un PTC, el PTC puede surgir de una mutación en dicho sujeto. La enfermedad se selecciona de: síndrome de Rett, fibrosis quística,  $\beta$ -talasemia, CBAVD, distrofinopatía, y distrofia muscular de Duchenne/Becker.

También se describe el uso de un ASO para uso en la fabricación de un medicamento, que, a su vez, para uso en un método como se define en una cualquiera de las reivindicaciones presentadas.

Métodos



En algunos casos, se proporciona un método para inhibir la NMD de ARNm de una manera específica de un gen. La expresión "específico de un gen" significa que el método inhibe la NMD de ARNm expresado a partir de un gen específico o particular, tal como un gen que contiene una mutación que causa una enfermedad (por ejemplo, una mutación terminadora), como se describe aquí. En algunos casos, el gen contiene un PTC de origen natural, por ejemplo el PTC no resulta de una mutación. Típicamente, el método implica inhibir la NMD de ARNm en una célula, tal como una célula eucariota. Sin embargo, en algunos aspectos, el método comprende inhibir la NMD de ARNm en un lisado celular o un sistema reconstituido *in vitro*, por ejemplo para el estudio de NMD y la inhibición de NMD.

En algunos casos, el método implica poner en contacto una célula con un ASO capaz de inhibir la NMD de ARNm (un ASO que inhibe la NMD de ARNm), como se describe en el presente documento. El término "poner en contacto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a exponer una célula al ASO de tal manera o en condiciones tales que el ASO entra en la célula. Véase, por ejemplo, Juliano et al., *Bioconjug Chem.* 2012 Feb 15;23(2):147-57. El ASO se suministra al interior de la célula y entra al núcleo celular. En un caso, la célula se pone en contacto con un vector (por ejemplo, un genoma viral, un plásmido, un cromosoma artificial) que entra en la célula. En la célula, el vector provoca la expresión del ASO en la célula, por ejemplo del genoma celular o a partir de un ácido nucleico exógeno. El ASO puede introducirse en células *in vivo* o *ex vivo* (en cuyo caso las células resultantes se introducen en un individuo que necesita terapia). El individuo puede ser un ser humano, un mamífero no humano, otro vertebrado, o una planta. Los ASOs se pueden proporcionar a un individuo mediante cualquiera de una variedad de métodos, tales como los descritos por Juliano et al. citado anteriormente, tal como el suministro de ASOs "libres" o "desnudos" que son absorbidos por algunas células, el suministro de ASOs conjugados a péptidos que penetran en las células (CPPs, por ejemplo péptidos TAT y de Antennapedia), suministro de ASOs conjugados a ligandos para la aborción mediante receptores celulares (por ejemplo, conjugados de ASO-colesterol, conjugados de ASO-folato, conjugados de N-acetil galactosamina, conjugados de ASO-factor 1 de crecimiento similar a insulina, conjugados de ASO-péptido RGD, conjugados de ASO-bombesina, etc.), suministro de ASOs asociados con nanoportadores (por ejemplo, portadores a base de lípidos, ASOs asociados con nanopartículas de perfluorocarbono, conjugados de ASO-anticuerpo, etc.). Otros métodos para el suministro de ácidos nucleicos, tales como los ASOs, son conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, la formación de conjugados de ácidos nucleicos con ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo hexil-S-tritilol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo dodecanodiol o restos de undecilo (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), o un resto de octadecilamina o de hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937).

El ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir o bloquear el depósito o unión de EJC en una unión exón-exón (por ejemplo, en un ARNm que contiene un PTC, como se describe aquí) en el núcleo, e inhibe la NMD. Aunque no se está limitado por la teoría, se cree que el ASO se une a un ARNm y bloquea el depósito del EJC en el núcleo. Sin embargo, el ASO puede competir con el EJC por la unión (o sus componentes) y/o desplazar el EJC (o sus componentes) en el citoplasma. Como se usa en el presente documento, la expresión "inhibición de la NMD" significa reducir (parcial o completamente) el grado en el que se produce la NMD. La inhibición de NMD da como resultado un aumento en los niveles de un ARNm (por ejemplo, un aumento medible en el nivel o cantidad de un ARNm particular). Por ejemplo, la inhibición de la NMD de un ARNm de *HBB* que contiene un PTC da como resultado un aumento medible en la cantidad de ARNm de *HBB* total. La inhibición de NMD da como resultado un aumento en los niveles de ARNm de 5% o más, tal como 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 1000%, 1500%, 2000%, 2500%, 3000%, 3500%, 4000%, 4500%, 5000% o más, en comparación con los niveles de ARNm en ausencia del ASO/ausencia de tratamiento (por ejemplo, niveles citoplasmáticos del ARNm que contiene un PTC en el que no hay ASO presente en la célula). La inhibición de NMD da como resultado un aumento en los niveles de ARNm de 5% o más, como 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% de los niveles de ARNm de tipo salvaje (por ejemplo, niveles de ARNm citoplasmático de tipo salvaje en los que el gen/ARNm no contiene una mutación terminadora). La inhibición de NMD puede dar como resultado niveles de ARNm que son mayores que los niveles de tipo salvaje. En algunos casos, la inhibición de NMD da como resultado un aumento medible de entre 20% y 40%. La inhibición de NMD da como resultado un aumento de 1.01, 1.05, 1.10, 1.25, 1.50, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 veces o más en los niveles de ARNm, en comparación con los niveles de ARNm en ausencia de ASO/ausencia de tratamiento (por ejemplo, niveles citoplasmáticos del ARNm que contiene un PTC en el que no hay ASO presente en la célula) o niveles de tipo salvaje. Los métodos para medir o cuantificar los niveles de ARNm son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, RT-PCR, RT-qPCR, análisis de micromatrices, análisis de transferencia Northern, análisis de protección de RNasa, o cualquier otro método

adecuado, por ejemplo como se describe in Rio, DC, RNA: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011.

La inhibición de NMD da como resultado un aumento del nivel de proteína (por ejemplo, según se codifica por *HBB*, *MECP2*, *CFTR*, *DMD*, *IDUA* etc.), por ejemplo el nivel de un producto proteico de un ARNm que contiene un PTC que fue diana de un ASO. Por ejemplo, la inhibición de la NMD de un ARNm de *HBB* que contiene PTC da como resultado un aumento medible en la cantidad de proteína total traducida del ARNm de *HBB*. El producto proteico puede ser una proteína truncada o de longitud completa. En algunos aspectos, la inhibición de NMD da como resultado un aumento en los niveles de ARNm de 5% o más, tales como 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, 500%, 550%, 600%, 650%, 700%, 750%, 800%, 850%, 900%, 1000%, 1500%, 2000%, 2500%, 3000%, 3500%, 4000%, 4500%, 5000% o más, en comparación con los niveles de proteína en ausencia del ASO/ausencia de tratamiento (por ejemplo, niveles de expresión de la proteína truncada en la que no hay ASO presente en la célula) o niveles de tipo salvaje (por ejemplo, niveles de expresión de la proteína de tipo salvaje en la que el gen/ARNm no contiene una mutación terminadora). En algunos aspectos, la inhibición de NMD da como resultado un incremento de 1.01, 1.05, 1.10, 1.25, 1.50, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100- o más veces en los niveles de proteína, en comparación con los niveles de proteína en ausencia de ASO/ausencia de tratamiento o niveles de tipo salvaje. Los métodos para medir o cuantificar los niveles de proteínas son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, análisis de transferencia Western, inmunocitoquímica, citometría de flujo, espectrometría de masas, o cualquier otro método adecuado, por ejemplo como se describe en Link, A.J., Proteomics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

En otro caso, el método es un método para inhibir el depósito (por ejemplo, inhibiendo la unión o la formación) de complejos de la unión de exones (EJCs) de una manera específica de un gen. El método comprende identificar una unión exón-exón que está en dirección 3' de un PTC en ARNm transcrito de un gen, por ejemplo un gen mutante sin sentido que causa una enfermedad (por ejemplo, *HBB*, *CFTR*, *MECP2*, *DMD*, *IDUA*) o un gen que contiene un PTC de origen natural (por ejemplo, como se describe en el presente documento), e introducir en la célula (por ejemplo, oinuedi en contacto la célula con) un ASO específico para el ARNm en condiciones en las que se produce el bloqueo de la unión o depósito del EJC en la unión exón-exón identificada. En un caso, la unión exón-exón identificada es aquella que, cuando está unida por un EJC, identifica o marca el ARNm para NMD, por ejemplo como se describe aquí. En otro caso, la unión exón-exón es aquella que, cuando está unida, no identifica ni marca el ARNm para la NMD. Por una unión exón-exón "unida por un EJC", se entiende que el EJC está unido adyacente y en dirección 5' de la unión, como se describe aquí. En algunos aspectos, el método implica identificar una o más uniones exón-exón unidas por EJC. Los métodos para identificar las uniones exón-exón (unidas por EJC) son conocidos, e incluyen, por ejemplo, los descritos en la sección de Ejemplos, por ejemplo inmunoprecipitación de ARN (RIP) o CLIP-seq. Véase también Seth et al., Cold Spring Harbor Protoc. 2009 Jun; 2009(6):pdb.prot5234. Típicamente, se introduce una cantidad suficiente (por ejemplo, como se describe en el presente documento) del ASO para bloquear la unión o depósito del EJC a la unión exón-exón. En un ejemplo, se puede determinar una cantidad suficiente para bloquear el depósito de EJC basándose en el análisis de RIP, como se describe en el presente documento.

En otro caso, se proporciona un método para aumentar la cantidad de una proteína truncada codificada por un gen que contiene una mutación terminadora (por ejemplo, una mutación terminadora que causa una enfermedad), o un gen que contiene un PTC de origen natural (por ejemplo, como se describe aquí). En algunos ejemplos, la proteína truncada expresada del gen o ARNm que contiene la mutación terminadora sigue siendo funcional, pero, debido a la PTC resultante de la mutación terminadora, parte del ARNm se degrada (por NMD) y solo se produce una pequeña cantidad de proteína truncada, que conduce a un estado de enfermedad (por ejemplo, como resultado de cantidades insuficientes de la proteína). De este modo, en algunos aspectos, es beneficioso bloquear o inhibir la NMD del ARNm expresado a partir de dicho gen, aumentando así los niveles de ARNm disponible y dando como resultado niveles aumentados de la proteína truncada funcional. Por ejemplo, el fenotipo de la enfermedad de Ullrich es causado por una deficiencia en la proteína de colágeno VI  $\alpha 2$ . Se descubrió que la inhibición parcial de NMD (en este caso globalmente) restaura niveles adecuados de la proteína de colágeno truncada para ensamblarse con otras fibras de colágeno, lo que lleva a la restauración parcial de una matriz extracelular funcional en fibroblastos humanos (Usuki et al., Ann Neurol. 2004, 55:740-744; Usuki et al., Mol. Ther. 2006, 14:351-360).

El método implica identificar una unión exón-exón que está en dirección 3' de un PTC en un ARNm, tal como el ARNm transcrito en una célula eucariota (por ejemplo, una célula humana, tal como las de un ser humano individual), como se describe en el presente documento. El método implica además introducir en la célula eucariota un ASO específico de una región del ARNm que está en dirección 5' de la unión exón-exón identificada, por ejemplo como se describe en el presente documento. El método se lleva a cabo en condiciones bajo las cuales el ASO entra en la célula (por ejemplo, el núcleo de la célula) en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en dirección 5' de la unión exón-exón identificada (por ejemplo, como se describe en el presente documento), e inhibir la NMD del ARNm, lo que da como resultado una mayor producción de proteínas, por ejemplo mayores niveles de la proteína truncada. En algunos casos, se introduce, suministra, o administra una cantidad eficaz del ASO, como se describe en el presente documento, para aumentar los niveles de la proteína truncada en cantidades suficientes para mejorar

un estado de enfermedad (por ejemplo, un estado de enfermedad causado por niveles insuficientes de una proteína, truncada o no, debido a la presencia de un PTC en el gen/ARNm que codifica la proteína).

En algunos casos, el método implica además poner en contacto, introducir, suministrar, o administrar a la célula (por ejemplo, como se describe aquí) uno o más fármacos o compuestos que promueven la lectura del PTC. Por "promoción de la lectura", se entiende que el fármaco o compuesto afecta la traducción de un ARNm que contiene PTC, lo que da como resultado la incorporación de un aminoácido en el PTC en la cadena de polipéptidos en crecimiento naciente, en lugar de la terminación de la traducción y la generación de una proteína truncada, que de otro modo ocurriría). Por ejemplo, los fármacos de lectura, en algunos casos, mejoran la capacidad de los ARNt de aminoácido casi relacionados para competir con el complejo del factor de liberación para unir los PTC en el sitio ribosómico A. Al aumentar la frecuencia con la que los PTCs se recodifican en codones sensoriales, se puede producir suficiente proteína funcional de longitud completa para proporcionar un beneficio terapéutico a los individuos que portan mutaciones terminadoras que causan una enfermedad, como se describe en el presente documento. Los métodos para determinar si un fármaco está promoviendo la lectura son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, análisis de transferencia Western, inmunohistoquímica, citometría de flujo, así como ensayos informadores basados en células como los descritos en la sección de Ejemplos. En algunos aspectos, la mejora en uno o más parámetros clínicos permite determinar si un fármaco de lectura aumenta efectivamente los niveles de proteína de longitud completa. En algunos aspectos, incluso aumentos moderados o leves en la cantidad de proteína de longitud completa son beneficiosos para aliviar algunos estados de enfermedad. Por ejemplo, la enfermedad de almacenamiento lisosómico mucopolisacaridosis de tipo I-Hurler (MPS IH, causada por una mutación terminadora que da como resultado niveles disminuidos de iduronidasa), tiene un umbral bajo para la corrección, ya que <1% de la función de iduronidasa de tipo salvaje puede moderar significativamente el fenotipo clínico (Ashton et al., *Am. J. Hum. Genet.* 1992, 50: 787-794, Bunge et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1998, 1407: 249-256). De este modo, aumentar la cantidad de proteína de longitud completa, en algunos aspectos, para alcanzar el 1% de los niveles de tipo salvaje, es beneficioso en el tratamiento de algunas enfermedades causadas por mutaciones terminadoras. En algunos ejemplos, el método da como resultado un aumento de al menos 5%, tal como 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, o un aumento del 100%, en la cantidad de proteína de longitud completa producida, por ejemplo en comparación con niveles de tipo salvaje (por ejemplo, niveles de expresión de la proteína de tipo salvaje en la que el gen/ARNm no contiene una mutación terminadora). En otros ejemplos, tal como la enfermedad de  $\beta$ -talasemia, el aumento de los niveles de las cadenas beta de hemoglobina de longitud completa conduce a estados de enfermedad corregidos o mejorados, tales como disminución o ausencia de anemia, disminución del cansancio, disminución de la disnea, y aumento de la tolerancia al ejercicio. Los métodos para controlar la mejora en el estado de la enfermedad de  $\beta$ -talasemia son conocidos, e incluyen, por ejemplo, oximetría de pulso, electroforesis de hemoglobina; transferrina sérica, ferritina, análisis de capacidad de unión a Fe; análisis de urobilina y urobilinógeno en orina; prueba de frotis de sangre periférica; análisis de hematocrito; y análisis de bilirrubina sérica.

En algunos casos, el fármaco de lectura es ataluren (PTC124, PTC Therapeutics, South Plainfield, New Jersey), o un aminoglicósido (por ejemplo, fármacos que generalmente consisten en dos a tres aminoazúcares unidos a un anillo de 2-desoxiestreptamina por enlaces glicosídicos), tales como amikacina, arbekacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rodoestreptomina, estreptomina, tobramicina, apramicina, G418 (geneticina), y lividomicina, o sales y derivados de los mismos. Sin embargo, a ciertas dosis, se ha demostrado que estos fármacos son tóxicos. Así, en algunos aspectos, el fármaco de lectura es un análogo de aminoglicósido que tiene una toxicidad más baja o nula, por ejemplo NB30, un derivado de paromomicina; NB54, que combina componentes de paromomicina y amikacina; y NB84, que se compone de elementos estructurales de paromomicina, amikacina y G418. Estos compuestos muestran una reducción de más de 10 veces en la toxicidad celular en comparación con los aminoglicósidos clásicos, y se encontró que cada uno de los compuestos restaura una cantidad significativa de proteína funcional en células de mamíferos que portan PTCs relacionados con el síndrome de Usher, el síndrome de Rett, la fibrosis quística, y mucopolisacaridosis I-Hurler (MPS IH) (16). Otros fármacos o compuestos que promueven la lectura incluyen el antibiótico dipeptídico negamicina, así como los compuestos identificados en un examen realizado por Du et al., (*J. Exp. Med.* 2009;206(10):2285-97), por ejemplo *N*-(sec-butil)-*N*-feniltiourea; 1,2-di-2-furil-2-hidroxietanona; yoduro de 1-metil-9-oxo-9H-indeno[2,1-b]piridinio; 2,2'-[1,4-fenilenbis(metililidenonitrilo)]bis(5-metilfenol); 3-metil-5-[[5-(2-nitrofenil)-2-furil]metilen]-2-tioxo-1,3-tiazolidin-4-ona; 5-bencil-2-metil-2-(4-nitrofenil)-2,3-dihidro-1,3,4-tiadiazol; 5-hidroxi-5-metil-2-fenil-3-isoxazolidinona; 2-(3-piridinilmetilen)-1-benzotiofen-3(2H)-ona; 2-imino-5-[[5-(2-nitrofenil)-2-furil]metilen]-1,3-tiazolidin-4-ona; 4-terc-butil-2-[(3-nitrobenciliden)amino]fenol; óxido de [4-(difluorometoxi)benciliden](fenil)azano; y 1-[(4-nitrofenil)sulfonil]-1H-pirrol.

En otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para aumentar la eficacia de un fármaco de lectura. Como se describe en el presente documento, los fármacos de lectura reducen la eficiencia de la terminación de la traducción en un PTC en marco. Los métodos actuales aumentan la eficacia de los fármacos de lectura, por ejemplo, inhibiendo la NMD de una manera específica de un gen, proporcionando así mayores niveles de transcritos disponibles para traducción y supresión o lectura de PTCs contenidos en ellos. Por consiguiente, el método comprende identificar una unión exón-exón que está en dirección 3' de un PTC en ARNm transcrito en una célula eucariota de un gen mutante sin sentido que causa una enfermedad (por ejemplo, como se describe en el presente documento) o un gen que contiene un PTC de origen natural (por ejemplo, como se describe aquí). En algunos aspectos, el método implica identificar una o más uniones exón-exón con EJC. El método comprende además

introducir en la célula (por ejemplo, en el núcleo de la célula) un ASO específico de una región del ARNm en dirección 5' de la unión o uniones exón-exón identificadas, en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC, inhibiendo la NMD del ARNm, por ejemplo como se describe en el presente documento. El método comprende además introducir en la célula una composición (por ejemplo, que comprende un fármaco o compuesto proporcionado aquí) que promueve la lectura del PTC introducido por la mutación terminadora. Típicamente, la composición se introduce en cantidad suficiente, o en una cantidad eficaz, para dar como resultado una mayor lectura del PTC en el ARNm que la que se produciría en ausencia de la composición. El aumento de la lectura del PTC da como resultado un aumento de la proteína de longitud completa en comparación, por ejemplo, con los niveles de proteína de longitud completa en ausencia de la composición (por ejemplo, como se describe en el presente documento). En algunos aspectos, el método mejora o previene enfermedades o afecciones, tales como las que se proporcionan aquí, por ejemplo cuando el método se realiza en células de un individuo, por ejemplo un ser humano.

En otro aspecto de la presente descripción, se proporcionan métodos para tratar un individuo que tiene una enfermedad o trastorno causado por una mutación terminadora. "Individuo", como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo individual. En algunos aspectos, "individuo" puede usarse indistintamente con "sujeto" o "paciente". En algunos casos, un individuo es un mamífero, por ejemplo un ser humano, un primate no humano, un ratón, una rata, un gato, un perro, un ganado, una cabra, un cerdo, una oveja, o una planta. En algunos casos, el individuo es un ser humano que tiene o tiene un mayor riesgo de tener una enfermedad o trastorno causado por una mutación terminadora. Si un individuo tiene "un mayor riesgo" de tener una enfermedad o trastorno causado por una mutación terminadora, el método implica un tratamiento preventivo o profiláctico. Por ejemplo, un individuo puede tener un mayor riesgo de tener dicha enfermedad o trastorno debido a los antecedentes familiares de la enfermedad (por ejemplo, el individuo tiene una predisposición genética). Muchas de las enfermedades y trastornos descritos en el presente documento son principalmente, si no completamente, enfermedades de base genética, por ejemplo  $\beta$ -talasemia (mutaciones terminadoras en *HBB*), síndrome de Rett (mutaciones terminadoras en *MECP2*), fibrosis quística (mutaciones terminadoras en *CFTR*), y distrofia muscular de Duchenne/Becker (mutaciones terminadoras en *DMD*). De este modo, en algunos aspectos, un individuo que tiene una o más mutaciones terminadoras en estos genes (u otros asociados con enfermedades o trastornos causados por mutaciones terminadoras) pero que aún no ha sido diagnosticado con dicha enfermedad o trastorno, es un individuo con mayor riesgo de tener una enfermedad o trastorno causado por una mutación terminadora. Típicamente, las personas con un mayor riesgo de tener una enfermedad o trastorno de este tipo se benefician del tratamiento profiláctico (por ejemplo, al prevenir o retrasar el comienzo o progresión de la enfermedad o trastorno).

El método descrito comprende administrar a un individuo una composición farmacéutica (por ejemplo, como se describe en el presente documento) que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ASO que inhibe la NMD de un ARNm que contiene PTC expresado a partir de un gen que comprende una mutación terminadora que causa una enfermedad en el individuo. Dichos genes que pueden comprender una mutación terminadora que causa una enfermedad incluyen, pero no se limitan a, *HBB*, *MECP2*, *CFTR*, *DMD* e *IDUA*. Se pueden encontrar mutaciones terminadoras adicionales en la Base de Datos de Mutaciones Genéticas Humanas (HGMD). En la Tabla 1 se proporcionan ejemplos de alelos específicos de estos genes que comprenden una mutación terminadora.

En algunos casos, el método comprende administrar cantidades terapéuticamente eficaces de composiciones farmacéuticas proporcionadas a un individuo que tiene o tiene un mayor riesgo de tener una enfermedad o trastorno seleccionado de la siguiente lista no limitante: síndrome de Usher, ataxia telangiectasia, hemofilia A y B, Enfermedad de Hailey-Hailey, enfermedad de Ullrich, acidemia metilmalónica, deficiencia de carnitina palmitoiltransferasa 1A, trastornos de la biogénesis del peroxisoma, distrofia muscular de la cintura y extremidades, condrodisplasia metafisaria de Schmid, enfermedad de Sandhoff, síndrome de Marfan, anemia, epidermolísis ampollosa simple, enfermedad de Tay-Sachs, deficiencia de triosa fosfato isomerasa, enfermedad de Alzheimer, síndrome de QT largo, resistencia a la insulina, enfermedad de la orina con olor jarabe de arce, intolerancia hereditaria a la fructosa, inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X, cánceres hereditarios tales como los debidos a mutaciones terminadoras de *BRCA1*, trastornos del metabolismo de hidratos de carbono, trastornos del metabolismo de los aminoácidos, trastornos del metabolismo de las lipoproteínas, trastorno del metabolismo de lípidos, trastornos del metabolismo de enzimas lisosomales, trastornos del metabolismo de esteroides, trastornos del metabolismo de purinas, trastornos del metabolismo de pirimidina, trastornos del metabolismo de metales, trastornos del metabolismo de porfirina, y trastornos del metabolismo del grupo hemo.

Aquí se describe un método para tratar un individuo que tiene o tiene un mayor riesgo de tener  $\beta$ -talasemia. El método comprende administrar al individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un (al menos uno, uno o más) ASO que inhibe la NMD de un ARNm que contiene PTC expresado a partir de un alelo *HBB* en el individuo. Los ejemplos de alelos *HBB* incluyen, pero no se limitan a, los proporcionados en la Tabla 1 (por ejemplo, CM810001, CM880039, CM034660, CM880040, y CM900122). En algunos casos, el ASO comprende una secuencia seleccionada de una secuencia proporcionada en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NOs: 1-19. En algunos casos, el ASO comprende una secuencia representada por la SEQ ID NO:15 o la SEQ ID NO:16. Como se usa en esta solicitud, la expresión "un (al menos uno, uno o más) ASO" significa que todos los ASOs usados son iguales (por ejemplo, todos tienen la misma secuencia) y/o que se usa una variedad de ASOs (por ejemplo, ASOs que tienen dos o más secuencias diferentes).

En algunos casos, el método comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más fármacos que promueven la lectura de PTCs, por ejemplo como se describe en el presente documento. En algunos casos, el uno o más fármacos es un aminoglicósido o sales, análogos o derivados del mismo. Se pueden seleccionar uno o varios aminoglicósidos del grupo no limitante que consiste en amikacina, arbekacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rodoestrestomicina, estreptomycin, tobramicina, apramicina, G418 (geneticina), lividomicina, NB30, NB54, o NB84. En algunos casos, el uno o más fármacos no es un aminoglicósido. Los ejemplos de fármacos que promueven la lectura pero no son aminoglicósidos son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, negamicina, clitocina, ácidos acetilaminobenzoicos tales como ácido 3-[2-(4-terc-butil-fenoxi)-acetilamino]-benzoico y ácido 3-{2-[4-(1,1-dimetilpropil)-fenoxi] acetilamino}-benzoico, compuesto de lectura (RTC) # 13, RTC#14, eritromicina, oleandomicina, tilosina, espiramicina, y josamicina. Las sales, análogos o derivados de cualquiera de los fármacos mencionados anteriormente pueden usarse para practicar los métodos descritos en el presente documento. El fármaco que promueve la lectura de PTCs puede administrarse simultáneamente, secuencialmente, o como parte de la misma composición farmacéutica que comprende el ASO o ASOs. En algunos casos, el método comprende además administrar una composición farmacéutica (por ejemplo, que comprende un fármaco o compuesto proporcionado aquí) que inhibe la NMD, por ejemplo como se describe aquí.

También se describe en el presente documento un método para tratar un individuo que tiene o tiene un mayor riesgo de tener el síndrome de Rett. El método comprende administrar al individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ASO que inhibe la NMD de un ARNm que contiene PTC expresado a partir de un alelo *MECP2* en el individuo. Los ejemplos de alelos *MECP2* incluyen, pero no se limitan a, los proporcionados en la Tabla 1 (por ejemplo, CM060329, CM023409, HM971529, CM010332, CM057720, CM010333, CM035705, CM055984, y CM076290). En algunos casos, el ASO comprende una secuencia seleccionada de una secuencia proporcionada en el presente documento, por ejemplo SEQ ID NOs: 20-38. En algunos casos, el ASO comprende una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:32.

En algunos casos, el método comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más fármacos que promueven la lectura de PTCs, por ejemplo como se describe y se proporciona aquí.

También se describe en el presente documento un método para tratar un individuo que tiene o tiene un mayor riesgo de tener fibrosis quística y/o CBAVD. El método comprende administrar al individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ASO que inhibe la NMD de un ARNm que contiene PTC expresado a partir de un alelo *CFTR* en el individuo. Los ejemplos de alelos *CFTR* incluyen, pero no se limitan a, los proporcionados en la Tabla 1 (por ejemplo, CM960290, CM920186, CM993870, CM970297, CM900061, CM003260, CM993871, CM972963, CM920192, CM930137, CM900062, CM920194, CM024696, CM983581, CM983582, CM931253, y CM960291). En algunos casos, el ASO comprende una secuencia seleccionada de una secuencia proporcionada en el presente documento, por ejemplo SEQ ID NOs: 39-114.

En algunos casos, el método comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más fármacos que promueven la lectura de PTCs, por ejemplo como se describe y se proporciona aquí.

También se describe en el presente documento un método para tratar un individuo que tiene o tiene un mayor riesgo de tener DMD/BMD. El método comprende administrar al individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ASO que inhibe la NMD de un ARNm que contiene PTC expresado a partir de un alelo *DMD* en el individuo. Los ejemplos de alelos *CFTR* incluyen, pero no se limitan a, los proporcionados en la Tabla 1 (por ejemplo, CM054661, CM960494, CM040028, CM084901, CM043277, CM950349, CM070908, y CM022961). En algunos casos, el ASO comprende una secuencia seleccionada de una secuencia proporcionada en el presente documento, por ejemplo SEQ ID NOs: 115-190.

En algunos casos, el método comprende además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más fármacos que promueven la lectura de PTCs, por ejemplo como se describe y se proporciona aquí.

#### Composiciones farmacéuticas

En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un ASO como se define en las reivindicaciones adjuntas. De este modo, se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más ASOs y opcionalmente uno o más fármacos de lectura. En algunos aspectos, el ASO a los ASOs y el fármaco o fármacos adicionales (fármacos que no son ASOs específicos de las regiones diana unidas por EJC para la inhibición de NMD) se denominan agentes o ingredientes activos de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento. Las composiciones que comprenden ASO o ASOs y opcionalmente fármaco o fármacos adicionales pueden mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tomado solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales descritos anteriormente, para formar composiciones farmacéuticas. Un vehículo farmacéuticamente aceptable es compatible con el ingrediente o ingredientes activos de la composición (y preferiblemente, es capaz de estabilizarlo). Dichas composiciones se suministran o administran en cantidades eficaces para tratar un individuo, tal como un ser humano que tiene una enfermedad o trastorno resultante de una mutación terminadora, por ejemplo,

las descritas aquí. Para “tratar” una enfermedad significa reducir o eliminar un signo o síntoma de la enfermedad, estabilizar la enfermedad, y/o reducir o retrasar la progresión de la enfermedad. En algunos casos, “tratar”, “tratamiento” o “tratando” pretende incluir la profilaxis, mejora, prevención o cura de la enfermedad. Por ejemplo, el tratamiento de distrofias musculares de acuerdo con el uso de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento puede dar como resultado, por ejemplo, la prevención o ralentización de la degeneración muscular, la prevención o disminución de la fatiga, el aumento de la fuerza muscular, la reducción de los niveles sanguíneos de creatina cinasa (CK), la prevención o disminución de la dificultad con las habilidades motoras, prevención o disminución de las deformidades de las fibras musculares, el incremento de la cognición, la prevención o mejora de los síntomas epilépticos (por ejemplo, prevención o disminución de la actividad convulsiva; la disminución de la frecuencia de las convulsiones), la mejora de la función ocular, la restauración o prevención de anomalías oculares (por ejemplo, desprendimiento de retina), la prevención o mejora de anomalías distróficas (por ejemplo, según lo determinado por biopsia muscular), la inversión, reducción o prevención de la disfunción cardíaca (resultante, por ejemplo, de la miocardiopatía) manifestada por, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva y arritmias, etc. Además, el tratamiento de trastornos sanguíneos tales como anemia y  $\beta$ -talasemia de acuerdo con el uso de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento puede dar como resultado, por ejemplo, la disminución o ausencia de anemia, la disminución del cansancio, la disminución de la disnea, y el aumento de la tolerancia al ejercicio, según lo determinado por examen físico de rutina, así como la oximetría de pulso, la electroforesis de hemoglobina; análisis de transferrina sérica, ferritina, capacidad de unión a Fe; análisis de urobilina y urobilógeno en orina; prueba de frotis de sangre periférica; análisis de hematocrito; y análisis de bilirrubina sérica. El tratamiento de la fibrosis quística de acuerdo con el uso de las composiciones y los métodos proporcionados en el presente documento puede dar como resultado, por ejemplo, un aumento del aclaramiento mucociliar y una disminución de la inflamación y la infección de los pulmones, disminución de la hipertensión pulmonar, disminución de la mucosidad en los senos paranasales, aumento del crecimiento, aumento de la ingesta de alimentos y aumento de peso, disminución de la dificultad para respirar, disminución de la obstrucción intestinal, y falta de infertilidad en los hombres tratados en útero. El tratamiento del síndrome de Rett, de acuerdo con el uso de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, puede dar como resultado, por ejemplo, tratamiento postnatal en el desarrollo temprano (por ejemplo, en los primeros 18 meses después del nacimiento, y posteriormente), desarrollo normal del lenguaje y las habilidades motoras, poca o ninguna pérdida de uso intencional de las manos, poca o ninguna desaceleración adquirida en la tasa de crecimiento de la cabeza, ausencia o disminución de las irregularidades respiratorias tales como hiperventilación, retención de la respiración o suspiros, y prevención de comportamientos de tipo autista. En algunos aspectos, el tratamiento de las personas que padecen el síndrome de Rett en una etapa posterior de la vida puede provocar un aumento de la cognición, una mayor comunicación, una disminución de los movimientos estereotipados de la mano, una disminución de la prevalencia y/o duración de las convulsiones, y una disminución de los trastornos gastrointestinales, incluido el estreñimiento.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la invención pueden variarse para obtener una cantidad del ASO activo y opcionalmente otro u otros agentes que sean eficaces para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, combinación, y modo de administración. El nivel de dosificación seleccionado depende de la actividad del ASO particular y de otro u otros agentes, la vía de administración, la gravedad de la afección a tratar, la afección, y el historial médico previo del paciente a tratar. Sin embargo, está dentro de la habilidad de un experto en la técnica comenzar las dosis de las composiciones descritas en el presente documento a niveles inferiores a los requeridos para lograr el esfuerzo terapéutico deseado, y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. Una “cantidad terapéuticamente eficaz”, como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un compuesto y/o un agente terapéutico adicional, o una composición del mismo que da como resultado la mejora (completa o parcial) de una enfermedad o trastorno causado por una mutación terminadora, por ejemplo reducción (parcial o completa) de la gravedad y/o duración de la afección. Una cantidad terapéuticamente eficaz también se refiere a una cantidad que previene o retrasa el comienzo de una enfermedad o trastorno causado por una mutación terminadora. La cantidad terapéuticamente eficaz variará con la afección particular a tratar, la edad y la condición física del sujeto a tratar, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), la vía específica de administración, y factores similares están dentro del conocimiento y la experiencia del profesional de la salud. Por ejemplo, una cantidad eficaz puede depender de la duración durante la cual el sujeto haya tenido la enfermedad. En algunos aspectos, una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento cuando se administra a un sujeto da como resultado, por ejemplo, aumento de la fuerza muscular, aumento de la motilidad, restauración de la función muscular o fenotipo, disminución de la fatiga, disminución de la dificultad con las habilidades motoras, disminución de la anemia, disminución de los síntomas epilépticos, etc. En algunos aspectos, el efecto terapéutico o clínico deseado resultante de la administración de una cantidad eficaz de una composición descrita en el presente documento puede medirse o monitorizarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo mediante examen físico de rutina, monitorizando los niveles de creatina cinasa (CK) en la sangre de un sujeto, por electromiografía, por electroencefalografía (EEG), por oximetría de pulso, y/o por examen histológico de una biopsia muscular.

En las terapias de combinación, una cantidad eficaz puede referirse a cada agente individual o a la combinación como un todo, en las que las cantidades de todos los agentes administrados son eficaces juntas, pero en las que el agente componente de la combinación puede no estar presente individualmente en una cantidad eficaz.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento (por ejemplo, aquellas que contienen ASOs y opcionalmente fármacos de lectura) se pueden administrar a un sujeto por cualquier vía adecuada. Los ASOs y los fármacos de lectura pueden administrarse simultánea o secuencialmente. Si los ASOs y los fármacos de lectura se administran simultáneamente, se pueden administrar en una sola composición o en diferentes composiciones. Por ejemplo, los ASOs pueden administrarse en una primera composición (por ejemplo, por vía intravenosa), y los fármacos de lectura pueden administrarse en una segunda composición (por ejemplo, por vía oral). Si los ASOs y los fármacos de lectura se administran por separado, solo es necesario que se administren lo suficientemente cerca en el tiempo para tener el efecto deseado (por ejemplo, una mayor producción de proteínas). Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse por vía oral, incluyendo sublingual, rectal, parenteralmente, intracisternalmente, intravaginalmente, intraperitonealmente, tópicamente y transdérmicamente (como por polvos, ungüentos o gotas), bucal o nasalmente. El término administración "parenteral", como se usa en el presente documento, se refiere a modos de administración distintos a través del tubo digestivo, que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, intramamaria, intraocular, intravítrea, retrobulbar, intrapulmonar, intratecal, subcutánea e intraarticular. También se contempla la implantación quirúrgica, que incluye, por ejemplo, incrustar una composición de la descripción en el cuerpo tal como, por ejemplo, en el cerebro, en la cavidad abdominal, debajo de la cápsula esplénica, el cerebro o la córnea.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también se pueden administrar en forma de liposomas. Como se sabe en la técnica, los liposomas generalmente derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multilaminares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposoma pueden contener, además de un agente de la presente descripción, estabilizantes, conservantes, excipientes, y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33, y siguientes.

Las formas de dosificación para la administración tópica de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento incluyen polvos, aerosoles, pomadas e inhalantes como se describe en el presente documento. El o los agentes activos se mezclan en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante, amortiguador o propelente necesario que pueda requerirse. Las formulaciones oftálmicas, los ungüentos para los ojos, los polvos y las disoluciones también se consideran dentro del alcance de esta descripción.

Las composiciones farmacéuticas (por ejemplo, aquellas que contienen ASOs y opcionalmente fármacos de lectura) para inyección parenteral comprenden disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para reconstituir en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso. Los ejemplos de vehículos, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como el de oliva), y ésteres orgánicos inyectables tal como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, ácido fenol-sorbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede lograr mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento (por ejemplo, las que contienen ASOs y opcionalmente fármacos de lectura), es deseable retrasar la absorción del fármaco por inyección subcutánea o intramuscular. Este resultado puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de materiales cristalinos o amorfos con escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción del o de los agentes activos depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de uno o más agentes activos administrados por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el o los agentes en un vehículo oleoso.

Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices de microcapsulas del o de los agentes (por ejemplo, ASOs, fármacos de lectura) en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de agente o agentes a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del agente o agentes. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el o los agentes en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención viral o bacteriano, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril justo antes del uso.

5 Aquí también se describen métodos para la administración oral de las composiciones farmacéuticas descritas aquí. Las formas de dosificación sólidas orales se describen generalmente en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Ed., 1990 (Mack Publishing Co. Easton Pa. 18042) en el Capítulo 89. Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, trociscos o pastillas, sellos, peletes, y gránulos. Además, la encapsulación liposomal o proteínica se puede usar para formular las presentes composiciones (como, por ejemplo, microesferas proteínicas descritas en la patente U.S. n° 4.925.673). La encapsulación liposómica puede incluir liposomas que se derivatizan con varios polímeros (por ejemplo, patente de U.S. n° 5.013.556). En general, la formulación incluye el o los agentes (por ejemplo, ASOs y opcionalmente fármacos de lectura) e ingredientes inertes que protegen contra la degradación en el estómago y que permiten la liberación del material biológicamente activo en el intestino.

15 En tales formas de dosificación sólidas, el o los agentes se mezclan con o se modifican químicamente para incluir, al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable. El excipiente o vehículo preferiblemente puede permitir la absorción en el torrente sanguíneo desde el estómago o el intestino. En el caso más preferido, el excipiente o vehículo aumenta la absorción del agente o agentes, la estabilidad general del agente o agentes, y/o el tiempo de circulación del agente o agentes en el cuerpo. Los excipientes y vehículos incluyen, por ejemplo, citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o (a) cargas o extendedores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, celulosa, dextranos modificados, manitol y ácido silícico, así como sales inorgánicas tales como trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio, y diluyentes disponibles comercialmente tales como FAST-FLO®, EMDEX®, STARX 1500®, EMCOMPRESS® y AVICEL®, (b) aglutinantes tales como, por ejemplo, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, gomas (por ejemplo, alginatos, arábica), gelatina, polivinilpirrolidona y sacarosa, (c) humectantes, tal como glicerol, (d) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, carbonato de sodio, almidón, incluyendo el disgregante comercial a base de almidón, EXPLOTAB®, glicolato de almidón sódico, AMBERLITE®, carboximetilcelulosa de sodio, ultramilopectina, gelatina, piel de naranja, carboximetilcelulosa, esponja natural, bentonita, resinas de intercambio catiónico insolubles, y gomas en polvo tales como agar, karaya o tragacanto; (e) agentes retardadores de la disolución tales como parafina, (f) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario y ácidos grasos que incluyen ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico, (g) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, tensioactivos detergentes aniónicos que incluyen lauril sulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio, y dioctil sulfonato de sodio, detergentes catiónicos, tales como cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, detergentes no iónicos que incluyen laurmacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso y sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa; (h) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita, (i) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales, ceras, CARBOWAX® 4000, CARBOWAX® 6000, laurilsulfato de magnesio, y sus mezclas; (j) deslizantes que mejoran las propiedades de fluidez del fármaco durante la formulación y ayudan a la reorganización durante la compresión, que incluyen almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes amortiguadores.

Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como cargas en cápsulas de gelatina blandas y duras, usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

45 Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberan el ingrediente o ingredientes activos solamente, o preferentemente, en una parte del tubo digestivo, opcionalmente de una manera retrasada. Los materiales ejemplares incluyen polímeros que tienen solubilidad sensible al pH, tales como los materiales disponibles como EUDRAGIT®. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

El agente o agentes también pueden estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

55 Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del agente o agentes (por ejemplo, ASOs y opcionalmente fármacos de lectura), las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato bencílico, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfúrico, polietilenglicoles, ésteres de sorbitán de ácido graso, y mezclas de los mismos.



Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, colorantes, aromatizantes y perfumantes. Las composiciones orales se pueden formular y además contienen un producto comestible, tal como una bebida. La composición oral también se puede administrar por sonda oral.

- 5 Las suspensiones, además del ingrediente o ingredientes activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, tragacanto, y mezclas de los mismos.

También se contempla en el presente documento el suministro pulmonar de los ASOs y opcionalmente los fármacos de lectura. Los agentes se suministran a los pulmones de un mamífero mientras se inhalan, promoviendo así el recorrido del revestimiento epitelial del pulmón hacia el torrente sanguíneo. Véanse, Adjei et al., *Pharmaceutical Research* 7:565-569 (1990); Adjei et al., *International Journal of Pharmaceutics* 63:135-144 (1990) (acetato de leuprolida); Braquet et al., *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 13 (supl. 5): s. 143-146 (1989) (endotelina-1); Hubbard et al., *Annals of Internal Medicine* 3:206-212 (1989) ( $\alpha$ 1-antitripsina); Smith et al., *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 (1989) ( $\alpha$ 1-proteinasa); Oswein et al., "Aerosolization of Proteins", *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II*, Keystone, Colorado, March, 1990 (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs et al., *The Journal of Immunology* 140:3482-3488 (1988) (interferón- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), y Platz et al., patente U.S. n° 5.284.656 (factor estimulante de colonias-granulocitos).

Se contempla el uso en la aplicación de esta invención de una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, que incluyen, pero no se limitan a, nebulizadores, inhaladores de dosis medidas, e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la técnica.

Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles comercialmente adecuados para la aplicación de la invención son el nebulizador ULTRAVENT®, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, MO; el nebulizador ACORN II®, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, CO.; el inhalador de dosis medida VENTOL®, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, N.C.; y el inhalador de polvo SPINHALER®, fabricado por Fisons Corp., Bedford, MA.

Todos estos dispositivos requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación del agente o agentes descritos aquí. Típicamente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado, y puede implicar el uso de un material propelente apropiado, además de diluyentes, adyuvantes y/o vehículos útiles en la terapia.

- 30 La composición se prepara en forma de partículas, preferiblemente con un tamaño de partícula promedio de menos de 10  $\mu$ m, y lo más preferiblemente de 0,5 a 5  $\mu$ m, para el suministro más eficaz al pulmón distal.

Los vehículos incluyen hidratos de carbono tales como trehalosa, manitol, xilitol, sacarosa, lactosa y sorbitol. Otros ingredientes para uso en formulaciones pueden incluir lípidos, tales como DPPC, DOPE, DSPC y DOPC, tensioactivos naturales o sintéticos, polietilenglicol (incluso aparte de su uso en derivatización del inhibidor mismo), dextranos, tales como ciclodextrano, sales biliares, y otros potenciadores relacionados, celulosa y derivados de celulosa, y aminoácidos.

Además, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión, u otros tipos de vehículos.

40 Las formulaciones adecuadas para uso con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, típicamente comprenden un agente de la invención disuelto en agua. La concentración de ASOs varía y oscila, por ejemplo, de alrededor de 0,1 a alrededor de 25 mg por ml de disolución. La formulación también puede incluir un amortiguador y un azúcar simple (por ejemplo, para la estabilización de proteínas y la regulación de la presión osmótica). La formulación del nebulizador también puede contener un tensioactivo para reducir o prevenir la agregación, inducida por la superficie, de la composición inhibidora causada por la atomización de la disolución en la formación del aerosol.

45 Las formulaciones para uso con un dispositivo inhalador de dosis medida generalmente comprenden un polvo finamente dividido que contiene el agente suspendido en un propelente con la ayuda de un tensioactivo. El propelente puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tales como un clorofluorocarbono, un hidrocloreofluorocarbono, un hidrofluorocarbono, o un hidrocarburo, que incluye triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán y lecitina de soja. El ácido oleico también puede ser útil como tensioactivo.

50 Las formulaciones para dispensar desde un dispositivo inhalador de polvo comprenden un polvo seco finamente dividido que contiene el o los agentes y también pueden incluir un agente de carga, tal como lactosa, sorbitol, sacarosa, manitol, trehalosa o xilitol, en cantidades que facilitan la dispersión del polvo del dispositivo, por ejemplo 55 50 a 90% en peso de la formulación.

También se contempla el suministro nasal del o de los agentes y composiciones de la invención. El suministro nasal permite el paso del o de los agentes o composición al torrente sanguíneo directamente después de administrar el producto terapéutico a la nariz, sin la necesidad de depositar el producto en el pulmón. Las formulaciones para el suministro nasal incluyen aquellas con dextrano o ciclodextrano. También se contempla el suministro por transporte a través de otras membranas mucosales.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que se pueden preparar mezclando el agente o agentes con excipientes o vehículos no irritantes adecuados, tales como manteca de cacao, polietilenglicol o cera para supositorios, que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se derriten en el recto o la cavidad vaginal y liberan el agente activo.

Para facilitar el suministro del agente o agentes a través de la membrana celular y/o nuclear, se prefieren las composiciones de hidrofobia relativamente alta. El agente o agentes pueden modificarse de manera que aumente la hidrofobia, o los agentes pueden encapsularse en vehículos o disoluciones hidrófobos que dan como resultado una mayor hidrofobia.

En un aspecto, la invención proporciona kits que comprenden una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más ASOs y una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más fármacos de lectura e instrucciones para la administración de la composición farmacéutica. En algunos aspectos de la invención, el kit puede incluir un vial de preparación farmacéutica, un vial de diluyente de preparación farmacéutica, y el ASO o ASOs y agente o agentes adicionales. El vial de diluyente contiene un diluyente tal como disolución salina fisiológica para diluir lo que podría ser una disolución concentrada o polvo liofilizado del agente de la invención. En algunos casos, las instrucciones incluyen instrucciones para mezclar una cantidad particular del diluyente con una cantidad particular de la preparación farmacéutica concentrada, por lo que se prepara una formulación final para inyección o infusión. En algunos casos, las instrucciones incluyen instrucciones de uso en una jeringa u otro dispositivo de administración. En algunos casos, las instrucciones incluyen instrucciones para tratar un paciente con una cantidad eficaz de ASO o ASOs y agente o agentes adicionales opcionales. También se entenderá que los recipientes que contienen las preparaciones, si el recipiente es una botella, un vial con un tabique, una ampolla con un tabique, una bolsa de infusión, y similares, pueden contener indicios tales como marcas convencionales que cambian de color cuando la preparación ha sido esterilizada en autoclave o de otro modo.

## EJEMPLOS

La presente invención se ilustrará más específicamente mediante los siguientes Ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no está limitada por estos ejemplos de ninguna manera.

### **Ejemplo 1: Identificación de uniones exón-exón unidas a EJC ubicadas en dirección 3' de mutaciones terminadoras**

#### Razón fundamental

Aunque se sabe que los EJC se depositan inmediatamente en dirección 5' de aproximadamente 70% de cada unión exón-exón en cada gen (24, 25), es primordial determinar qué uniones exón-exón deben ser la diana de los ASOs para evitar el depósito de EJC. Usando ensayos de protección de RNasa H, las áreas protegidas con EJC se cartografiaron *in vitro*, exclusivamente en una región entre -20 a -24 nt en dirección 5' del extremo 3' de los exones de ensayo (23).

A través de la inmunoprecipitación de ARN y la amplificación por PCR de secuencias que rodean inmediatamente esta región, las uniones exón-exón unidas a EJC se identifican *in vivo*, en el contexto de los genes *RTT*, *CFTR*, *HBB*, *DMD* e *IDUA*.

#### Minigenes asociados a enfermedades

Dada la falta de líneas celulares con los alelos mutantes enumerados en la Tabla 1, con la excepción de las mutaciones *CFTR*-W1282X (células GM03401 e IB3 de Coriell) e *IDUA*-W402X, los experimentos se llevan a cabo usando minigenes transfectados en células HeLa, U2OS, HEK293, entre otras, o integrados en las células U2OS (como se describe en Hossain M, Stillman B, 2012, Meier-Gorlin syndrome mutations disrupt an Orc1 CDK inhibitory domain and cause centrosome reduplications. *Genes & Development* 26: 1797-810. Los minigenes se construyen de manera que conservan el marco, que incluyen un codón de iniciación, con todos los exones internos flanqueados por hasta 300 nt de secuencias intrónicas, como sigue: el minigén *RTT* incluye todos los exones de la isoforma 1 (2-4); el minigén *CFTR* incluye los exones 22-27; el minigén *HBB* incluye todos los exones (1-3); el minigén *DMD* incluye los exones 73-78; y el minigén *IDUA* incluye los exones 8-14. Puesto que los EJC pueden desempeñar un papel en la exportación de ARNm (26), la presencia de al menos un EJC en dirección 5' de las mutaciones a analizar garantiza la exportación de transcritos al citoplasma, incluso cuando el depósito de EJC en dirección 3' se bloquea deliberadamente. Los minigenes que se integran en la célula U2OS están flanqueados por ADNc que expresa GFP (extremo 5') y por la secuencia T7 (extremo 3') para determinar los niveles de proteína. El proceso de integración es el siguiente: los transgenes impulsados por un promotor temprano inmediato del citomegalovirus híbrido (CMV), que fue reprimido por una proteína represora regulada por tetraciclina, se integran de manera estable en una línea

celular U2OS que alberga un único sitio de integración FRT, dando lugar a líneas celulares isogénicas que expresan transgenes de tipo salvaje o que albergan PTC (HBB, CFTR o MECP2).

#### Inmunoprecipitación de ARN (RIP)

5 Para aislar regiones de ARN unidas a EJC, se realiza una versión ligeramente modificada de RIP (27) en combinación con digestión con nucleasa microcócica (MNasa) (28, 29) (FIG. 1). A los efectos del presente enfoque, la eIF4A3 endógena o etiquetada con T7 (la proteína de anclaje del EJC) se inmunoprecipita (IP) de los lisados de las células HeLa que expresan los minigenes anteriores. Brevemente, las células HeLa se cotransfectan con uno de los cuatro minigenes y con un vector vacío (pCGT7) o uno que expresa T7-eIF4A3. Cuarenta y tres horas después, las células se tratan con cicloheximida durante cinco horas para bloquear la ronda de traducción pionera, a fin de preservar los EJCs en los transcritos (25). Al principio, no se usa la reticulación antes de la recolección de las células, ya que esta etapa reduce la eficiencia de la recuperación de ARN. Sin embargo, si el protocolo da como resultado una baja eficiencia de co-IP de ARN, debido a las débiles interacciones eIF4A3-ARN, la reticulación mediante UV se realiza antes de la recolección de las células (26). Después del tratamiento con cicloheximida, las células se lisan en NP-40 al 0,2% y NaCl 200 mM. Los lisados se incuban con Dynabeads junto con anticuerpos específicos para eIF4A3 o T7. Después de que los complejos de RNPM se inmunoprecipitan, las regiones de ARN no protegidas se digieren con MNasa en presencia de  $\text{CaCl}_2$  5 mM (FIG. 2). El tiempo de digestión y la concentración de MNasa se optimiza para generar fragmentos de aproximadamente 60-70 nt de longitud. Las regiones protegidas de ARN unidas a eIF4A3 se atraen hacia abajo usando imanes, y las regiones libres sin protección se eliminan por lavado. Como control, también se generan IPs no digeridos (véase más abajo) (FIG. 1). El ARN se extrae posteriormente de las perlas usando Trizol.

#### Amplificación por RT-PCR de regiones inmunoprecipitadas

Para identificar las uniones exón-exón que co-IP con eIF4A3, se amplifica mediante PCR una ventana de 60 nt que abarca cada una de las uniones exón-exón en los cuatro minigenes (FIG. 1). Brevemente, primero se realiza la síntesis de ADNc usando cebadores aleatorios, seguido de la amplificación por PCR radioactiva de una región que abarca 50 nt del extremo 3' de un exón y 10 nt del extremo 5' del exón adyacente (FIG. 1). La amplificación de un producto que abarca la unión asegura la identificación de regiones protegidas por EJC que resultaron del ayuste. Además, para garantizar que la digestión con MNasa sea eficiente y que se detecte la unión de EJCs a ARNm específicamente en las uniones exón-exón, se realiza la amplificación por PCR de una región del mismo tamaño, que no se espera que esté unida a EJC, en el último exón de cada transcrito ("región de control") (FIG. 1). Si todas las condiciones funcionan correctamente, no se espera la amplificación de este producto en muestras tratadas con MNasa, mientras que es probable que esté presente en el control no digerido. Por el contrario, los productos de PCR correspondientes a las uniones exón-exón deben observarse tanto en muestras IP tratadas con MNasa como sin tratar. Para evaluar el enriquecimiento de las uniones exón-exón entre las áreas protegidas con EJC, se calcula la relación de productos de PCR tratados con MNasa sobre productos no tratados para cada fragmento (uniones exón-exón o regiones aleatorias). Si bien se espera una relación que se acerque a 0 para las "regiones de control", los productos correspondientes a las uniones exón-exón deberían dar como resultado una relación que se acerque a 1.

La metodología anterior confirma que las posibles uniones exón-exón a las que deben dirigirse los ASOs para abolir NMD tienen EJCs unidos en dirección 5'. Además, estos resultados arrojarán luz sobre la cuestión de si todas las uniones exón-exón están unidas por EJCs *in vivo*.

#### 40 Ejemplo 2: Identificación de ASOs que se dirigen a regiones unidas a EJCs para abolir NMD

##### Razón fundamental

Como la evidencia sugiere que la degradación del transcrito compite con la lectura traduccional, la abolición de la NMD aumenta la eficacia de los fármacos de lectura (5, 6). Hay varias formas conocidas de inhibición de NMD; sin embargo, todas ellas afectan a NMD globalmente, y un subconjunto también afecta a procesos celulares importantes (por ejemplo, traducción, señalización de PI3K).

En consecuencia, este trabajo proporciona una herramienta para abolir la NMD de una manera específica de un gen, de modo que pueda usarse de manera segura en pacientes. Dado que el EJC es un hito clave que distingue un PTC de una señal de terminación normal, si se bloquea el depósito de EJCs, no estaría presente ningún hito en el ARNm para resaltar la aparición de un PTC. En este escenario, un PTC tenderá a ser tratado como una señal de terminación normal, y NMD no se activaría. De este modo, como se demuestra en el presente documento, los ASOs dirigidos contra una región en la que se espera que los EJCs se unan evitan el depósito de EJCs, lo que recuerda cómo se puede alterar el ayuste bloqueando los sitios de unión del factor de ayuste usando ASOs (7-10). Como se desea minimizar los posibles efectos no deseados en el ayuste, se ensayan los ASOs que tienen una longitud de 15 nt, al menos inicialmente, para cubrir una región relativamente pequeña, al tiempo que conservan suficiente especificidad de unión. Los ASOs se diseñan típicamente para seleccionar como diana al menos a la región de -20 a -24 previamente dada a conocer a proteger por el EJC (FIG. 2) (23). El bloqueo del depósito de NMD es una nueva aplicación para ASOs, por lo que además de los ASOs modificados con MOE fosforotioato uniformes (por ejemplo,

como se describe aquí), otras químicas, por ejemplo, morfolino o 2'O Me ASOs (de Gene Tools, Philomath, OR), también se ensayan, para comparar su efectividad.

#### Evaluación del nivel de NMD para cada mutación de la enfermedad

5 Antes de seleccionar como dianas a las uniones exón-exón protegidas con EJC con ASOs, se evalúa el nivel de NMD para un subconjunto de las mutaciones enumeradas en la Tabla 1. En algunos ejemplos, es deseable comenzar con mutaciones ubicadas en el último supuesto exón unido a EJC, puesto que la selección como diana de solamente una unión cada vez simplificará la interpretación de los resultados. Una vez que se confirma la efectividad de prevenir el depósito de EJC por parte de los ASOs, se seleccionan como diana dos o más uniones. En algunos ejemplos, se seleccionan tres mutaciones para cada gen, y solo las mutaciones que conducen a un nivel de transcrito <50% del transcrito de tipo salvaje serán la diana de la microdeambulación de los ASOs (discutido a continuación). Si alguna de las mutaciones seleccionadas no cumple este criterio, se selecciona una nueva de la lista. En resumen, los minigenes que portan las mutaciones seleccionadas y sus versiones de tipo salvaje se cotransfectan en células HeLa con un vector que expresa GFP. Cuarenta y ocho horas después, se extrae ARN y se realiza RT-PCR radioactiva. Los productos correspondientes a los minigenes mutantes y de tipo salvaje se normalizan a la expresión de GFP, y se calcula el porcentaje del mutante con respecto al transcrito de tipo salvaje. En el caso de minigenes integrados en células U2OS, los productos de minigén de tipo salvaje y mutante se normalizan a genes de mantenimiento endógenos, por ejemplo *GAPDH*.

#### Microdeambulación de ASOs

20 Las microdeambulaciones de ASOs se realizan como se describió previamente (7), seleccionando totalmente una región que abarca 33 nt de -6 a -38 del extremo 3' de los exones que están unidos a EJC (FIG. 2). Brevemente, las líneas celulares que expresan minigenes que portan mutaciones en el último exón unido a EJC o sus versiones de tipo salvaje y GFP (por transfección usando lipofectamina o inducción con tetraciclina) se cotransfectan con cada uno de los ASOs de 15 meros, independientemente. En total, 19 ASOs que se desplazan consecutivamente por 1 nt se ensayan para cada unión exón-exón unida a EJC en dirección 3' de las mutaciones (FIG. 2). Esta metodología se siguió en el diseño de las secuencias para que los ASOs seleccionen como diana a alelos HBB que contienen PTC (por ejemplo, mutaciones terminadoras que causan una enfermedad) (véanse SEQ ID NOs 1-19), alelos MECP2 (véanse SEQ ID NOs 20-38), alelos CFTR (véanse SEQ ID NOs 39-114), alelos DMD (véanse SEQ ID NOs 115-190), y alelos IDUA (véanse SEQ ID Nos 191-268). Se ensayan diferentes concentraciones de ASOs para obtener una curva de respuesta frente a la dosis. En el caso de genes que contienen más de una unión exón-exón en dirección 3' de un PTC, los intermedios de minigén se construyen para detectar ASOs inhibidores de NMD, una unión cada vez y en combinación con el mejor ASO seleccionador de dianas que resultó de la detección de la unión en dirección 5'. Una representación esquemática del método se muestra en la FIG. 3. La anulación de NMD se evalúa mediante RT-PCR, y el porcentaje de transcrito mutante se calcula como se describe anteriormente. Debido a que algunos de los ASOs pueden interferir con los sitios de unión del factor de ajuste, es importante determinar si el ajuste de los exones seleccionados como diana se ve afectado negativamente. Solo se persiguen los ASOs que anulan la NMD sin efectos negativos en el ajuste.

#### RIP para evaluar el bloqueo de EJC mediado por ASO

40 RIP se usa para determinar si los ASOs que inhiben la NMD realmente bloquean el depósito de EJC. Brevemente, la RIP se realiza como se describió anteriormente, pero usando lisados de células HeLa que también se cotransfectan con los mejores ASOs inhibidores de NMD para cada minigén. Si un ASO bloquea el depósito de EJC, las uniones exón-exón que anteriormente estaban unidas a EJC ya no deberían co-IP con eIF4A3.

45 Este ejemplo proporciona experimentos clave que permiten el diseño y la determinación de ASOs que se pueden aplicar para seleccionar como diana el depósito de EJC. De este modo, la metodología identifica los ASOs que anulan la NMD de una manera específica de un gen, que no solo se puede aplicar para potenciar los fármacos de lectura y aumentar los niveles de proteínas truncadas funcionales, sino que también proporcionará un método para estudiar el depósito de EJC y los mecanismos de NMD. Usando métodos conocidos, los ASOs se pueden ensayar para determinar efectos y/o toxicidad fuera de la diana.

#### **Ejemplo 3: Combinación de ASOs inhibidores de NMD con fármacos de lectura para suprimir mutaciones terminadoras**

##### 50 Razón fundamental

Los estudios han demostrado una variabilidad significativa en la respuesta a ataluren (2, 18), un fármaco de lectura que se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase III para la fibrosis quística (18). Esta variabilidad se observa a menudo en pacientes que portan la misma mutación (por ejemplo, CFTR W1282X) (2, 18). En algunos casos, los pacientes con ciertas mutaciones no muestran respuesta a ataluren (por ejemplo, CFTR Q1313X) (18). Además de los pacientes con fibrosis quística, los pacientes con DMD con mutaciones terminadoras también han participado en estudios que usan ataluren como fármaco de lectura (3, 17). Además, se han ensayado otros fármacos de lectura para  $\beta$ -talasemia y el síndrome de Rett, entre otras enfermedades, usando líneas celulares de pacientes (6, 19, 20). Hasta ahora, el tratamiento con ataluren ha demostrado ser seguro para los pacientes, y

promete mejorar la vida de los pacientes. Sin embargo, una forma de inhibir la NMD en pacientes, sin efectos adversos, mejoraría en gran medida la efectividad de fármacos como el ataluren. En este sentido, la química de MOE fosforotioato ASO ha demostrado ser segura en estudios con animales y ensayos clínicos realizados hasta la fecha (21). Por lo tanto, se espera que el enfoque específico de genes para abolir la NMD descrito en el presente documento sea beneficioso para pacientes con alelos sin sentido para una amplia variedad de enfermedades genéticas, por ejemplo las que se proporcionan en el presente documento.

#### Construcción de un informador para la evaluación de la lectura

Dada la falta de líneas celulares que expresan la mayoría de los alelos mutantes abordados en esta descripción, se construyeron informadores para evaluar la efectividad del tratamiento combinado ASO + lectura. Brevemente, la secuencia de ADNc de GFP se coloca dentro del marco, en dirección 5' de cada minigén, y la secuencia T7 se coloca en dirección 3' de cada minigén (por ejemplo, como se describe en el presente documento). La señal de terminación traduccional natural de cada minigén se elimina y se coloca al final de T7. GFP permite la detección de cambios sutiles en la intensidad, que se correlacionan con la expresión/concentración de proteínas (30-32). Además, usando un anticuerpo específico para GFP, se ha demostrado que la detección de GFP puede ser lo suficientemente precisa como para evaluar la estequiometría de las proteínas que forman un complejo (30). De este modo, se usa una combinación de análisis FACS y transferencia Western con imágenes fluorescentes de infrarrojo cercano de anticuerpos acoplados a IRDye (LI-COR) para medir las diferencias en la eficacia de lectura tras el tratamiento con ASO.

#### Combinación tratamientos de ASO y de lectura

Usando los informadores de minigén descritos anteriormente, se ensaya una combinación de los mejores ASOs inhibidores de NMD y ataluren. Brevemente, los informadores de minigén que portan mutaciones terminadoras, y las respectivas versiones de tipo salvaje, se cotransfectan durante 48 horas en células HeLa con los ASOs seleccionadores de dianas. Dieciséis horas antes de la cosecha, las células se tratan con ataluren o DMSO (disolvente) como control, como se describió anteriormente (1). Ataluren se obtiene de Selleck Chemicals (Houston, Texas), y se usa típicamente a 5 µg/ml (1), además de comparar un intervalo de concentraciones. Después, las células se lisan en amortiguador de RIPA, y se realiza la transferencia Western para detectar la expresión de GFP. Estos resultados se comparan con las células tratadas con ASO de control que expresan los informadores de minigén y tratadas con ataluren, así como con las células tratadas con ASO de ensayo o de control, pero sin ataluren. Un ASO de control puede ser uno de los ASOs que no bloquea el depósito de EJC en la microdeambulación, un ASO para otra secuencia irrelevante, o un ASO que contiene varios desajustes o secuencias codificadas, en comparación con el ASO principal. Se espera un aumento en la producción de GFP cuando las células se tratan con ASOs seleccionadores de dianas, en comparación con las células tratadas con control de ASOs. Para confirmar que el bloqueo de NMD causa un aumento en la producción de GFP después del tratamiento con ataluren, se realiza un experimento de control que usa un ARN de interferencia corto frente a UPF1. Además, los resultados de la transferencia Western se validan analizando células de experimentos duplicados usando análisis FACS (por ejemplo, LSRII Cell Analyzer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) de la expresión de GFP.

La metodología del Ejemplo 4 permite determinar qué ASO en un paradigma de enfermedad particular es beneficioso como agente potenciador para ataluren. La abolición de NMD probablemente eliminará la variabilidad observada en respuesta a ataluren entre las células que portan la misma mutación, y finalmente en pacientes. Además, los ASOs inhibidores de NMD se pueden analizar en modelos de ratones transgénicos que portan genes humanos con mutaciones terminadoras. Como los MOE ASOs se han usado de manera segura en ratones y primates no humanos, y actualmente se encuentran en ensayos clínicos de fase I-III para diversas enfermedades (16), se espera que los ASOs inhibidores de la NMD sean igualmente seguros y eficaces.

#### **Ejemplo 5: Inhibición de NMD por ASOs dirigidos a un alelo *HBB*, *MECP2* o *CFTR* que contiene una mutación terminadora que causa una enfermedad**

##### Materiales y métodos

Se sintetizó un conjunto de 19 15meros de 2'-O-metoxietil fosforotioato (MOE-P=S) ASO que solapan dirigidos contra la región EJC canónica en el exón 2 de *HBB*. Estos se cotransfectaron individualmente a una concentración inicial de 50 nM usando Lipofectamine 2000 en células HeLa con un gen *HBB* que alberga una mutación terminadora en el codón 39 en el exón 2 (Q39X), que desencadena la NMD. Los niveles de ARNm de *HBB* ajustado se midieron entonces después de la expresión transitoria o inducida usando RT-PCR radioactiva. Juntos, los ASOs que solapan abarcan de -38 a -6 desde la unión exon2/exon 3. Los niveles de proteína truncada resultantes del tratamiento con ASO se evaluaron mediante análisis de transferencia Western usando anticuerpo anti-GFP.

Paralelamente, se generó un informador de minigén que consta de los exones 2, 3 y 4 de *MECP2* que portan la mutación S65X en el exón 3, así como su respectiva versión de tipo salvaje. Como se describió anteriormente, se obtuvieron 19 ASOs 15-meros que se dirigen a una región que abarca los nucleótidos -38 a -6 del límite del exón 3/4, y estos ASOs se transfectaron individualmente en células que expresan el informador mutante *MECP2* o el informador de tipo salvaje.

Además, se generaron minigenes que consisten en los exones CFTR 22-25, 22-26 y 22-27 que portan la mutación W1282X en el exón 23, así como su versión de tipo salvaje. Como se describió anteriormente, se obtuvieron 19 ASOs 15-meros que se dirigen a una región que abarca los nucleótidos -38 a -6 del límite de los exones 24/25, y se transfectan a células que expresan el minigén CFTR. Una vez que este examen identificó el mejor ASO inhibidor de NMD, se transfecta en combinación con cada uno de los 19 ASOs 15-meros que se dirigen a una región que abarca los nucleótidos -38 a -6 del límite de los exones 25/26. La mejor combinación resultante de ASOs (de cada límite exón-exón) se transfectó entonces en combinación con cada uno de los 19 ASOs 15-meros que se dirigen a una región que abarca los nucleótidos -38 a -6 del límite de los exones 26/27. Los niveles de ARNm de *CFTR* ajustado se midieron después de la expresión inducida usando RT-PCR radioactiva.

## 10 Resultados

Varios ASOs inhibieron la inclusión del exón 2 de *HBB*, generando un ARNm anormal, y poco o nada de ARNm ajustado correctamente. Otros no tuvieron ningún efecto, mientras que tres ASOs consecutivos dieron como resultado niveles de ARNm más altos que el ASO de control (FIG. 4A). Estos ASOs no tuvieron efecto sobre el nivel del ARNm WT, lo que es consistente con un efecto específico sobre el ARNm mutante sin sentido. Posteriormente, el ASO más potente se transfectó en células U2OS que expresan el minigén integrado GFP-HBB-T7 que porta el alelo Q39X. Se observó un aumento de 3,5 veces del transcrito Q39X tratado con ASO en comparación con el nivel de transcrito no tratado (FIG. 4B). Además, el análisis de transferencia Western usando anticuerpo anti-GFP detectó un aumento de 6 veces en los niveles de proteína truncada como resultado del transcrito Q39X tratado con ASO en comparación con el transcrito no tratado (FIG. 4C).

Los resultados de los experimentos de transfección independientes mostraron que la mayoría de los ASOs no tenían efecto sobre el nivel de ARNm de *MECP2* o sobre la eficiencia de ajuste. Sin embargo, un grupo distinto de ASOs aumentó significativamente el nivel de ARNm de *MECP2* S65X (FIG. 5A). El mejor ASO seleccionador de dianas aumentó el nivel de ARNm de *MECP2* S65X en aproximadamente 3,5 veces en comparación con el control no tratado (FIG. 5B). Como se esperaba, no se observó ningún efecto sobre el ARNm WT, lo que indica que el efecto depende de PTC.

El cribado de ASOs para cada uno de los límites en dirección 3' del CFTR-W1282X dio como resultado la identificación de tres ASOs de mejor direccionamiento que se ensayaron en combinación (FIG. 6A) o de forma independiente (FIG. 6B). Los resultados de RT-PCR muestran que inesperadamente la selección como diana de la última unión exón-exón de CFTR (26/27) tiene un efecto más pronunciado que la selección como diana de las tres uniones al mismo tiempo. Esta observación podría sugerir que la última unión exón-exón en el gen CFTR es la más importante para marcar el transcrito para NMD.

## Referencias

1. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007; 447:87-91
2. Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, Nissim-Rafinia M, Blau H, Rivlin J, Aviram M, Elfring GL, Northcutt VJ, Miller LL, Kerem B, Wilschanski M. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* 2008; 372:719-27
3. Finkel RS. Read-through strategies for suppression of nonsense mutations in Duchenne/ Becker muscular dystrophy: aminoglycosides and ataluren (PTC124). *J Child Neurol* 2010; 25:1158-64
4. Rebbapragada I, Lykke-Andersen J. Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate? *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21:394-402
5. Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, Yaacov Y, Virgiliis D, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem E, Kerem B. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest* 2007; 117:683-92
6. Linde L, Kerem B. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* 2008; 24:552-63
7. Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Bennett CF, Krainer AR. Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon. *PLoS Biol* 2007; 5:e73
8. Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, Krainer AR. Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice. *Am J Hum Genet* 2008; 82:834-48

9. Hua Y, Sahashi K, Hung G, Rigo F, Passini MA, Bennett CF, Krainer AR. Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev* 2010; 24:1634-44
10. Hua Y, Sahashi K, Rigo F, Hung G, Horev G, Bennett CF, Krainer AR. Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 2011; 478:123-6
- 5 11. Le Hir H, Séraphin B. EJCs at the heart of translational control. *Cell* 2008; 133:213-6
13. Hwang J, Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: to die or not to die, that is the question. *Curr Opin Genet Dev* 2011; 21:422-30
14. Linde L, Boelz S, Neu-Yilik G, Kulozik AE, Kerem B. The efficiency of nonsense-mediated mRNA decay is an inherent character and varies among different cells. *Eur J Hum Genet* 2007; 15:1156-62
- 10 15. Keeling KM, Wang D, Dai Y, Murugesan S, Chenna B, Clark J, Belakhov V, Kandasamy J, Velu SE, Baasov T, Bedwell DM. Attenuation of nonsense-mediated mRNA decay enhances in vivo nonsense suppression. *PLoS One*. 2013 Apr 10;8(4):e60478
16. Keeling and Bedwell. Suppression of nonsense mutations as a therapeutic approach to treat genetic diseases. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2011; 2(6):837-52
- 15 17. Gong Q, Stump MR, Zhou Z. J. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay by antisense morpholino oligonucleotides restores functional expression of hERG nonsense and frameshift mutations in long-QT syndrome. *Mol Cell Cardiol* 2011; 50:223-9
18. Pichavant C, Aartsma-Rus A, Clemens PR, Davies KE, Dickson G, Takeda S, Wilton SD, Wolff JA, Wooddell CI, Xiao X, Tremblay JP. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther* 2011;19:830-40
- 20 19. Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, Roussel D, Fritsch J, Hanssens L, Hirawat S, Miller NL, Constantine S, Reha A, Ajayi T, Elfring GL, Miller LL. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1262-72
- 25 20. Salvatori F, Breveglieri G, Zuccato C, Finotti A, Bianchi N, Borgatti M, Feriotto G, Destro F, Canella A, Brognara E, Lampronti I, Breda L, Rivella S, Gambari R. Production of beta-globin and adult hemoglobin following G418 treatment of erythroid precursor cells from homozygous beta(0)39 thalassemia patients. *Am J Hematol*. 2009; 84:720-8
- 30 21. Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11:125-40
22. Vecsler M, Ben Zeev B, Nudelman I, Anikster Y, Simon AJ, Amariglio N, Rechavi G, Baasov T, Gak E. Ex vivo treatment with a novel synthetic aminoglycoside NB54 in primary fibroblasts from Rett syndrome patients suppresses MECP2 nonsense mutations. *PLoS One* 2011; 6:e20733
- 35 23. Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ. The spliceosome deposits multiple proteins from about 20 to about 24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* 2000; 19:6860-9
24. Singh G, Kucukural A, Cenik C, Leszyk JD, Shaffer SA, Weng Z, Moore MJ. The cellular EJC interactome reveals higher-order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus. *Cell*. 2012 Nov 9;151(4):750-64
- 40 25. Saulière J, Murigneux V, Wang Z, Marquet E, Barbosa I, Le Tonquèze O, Audic Y, Paillard L, Roest Crollius H, Le Hir H. CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-wide mapping of the human exon junction complex. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Nov;19(11):1124-31
26. Le Hir H, Gatfield D, Izaurralde E, Moore MJ. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J* 2001; 20:4987-97
27. Keene JD, Komisarow JM, Friedersdorf MB. RIP-Chip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nat Protoc* 2006; 1:302-7
- 45 28. Yeo GW, Coufal NG, Liang TY, Peng GE, Fu XD, Gage FH. An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16:130-7
29. Ule J, Jensen KB, Ruggiu M, Mele A, Ule A, Darnell RB. CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* 2003; 302:1212-5
- 50 30. Cristea IM, Williams R, Chait BT, Rout MP. Fluorescent proteins as proteomic probes. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4:1933-41

31. Timney BL, Tetenbaum-Novatt J, Agate DS, Williams R, Zhang W, Chait BT, Rout MP. Simple kinetic relationships and nonspecific competition govern nuclear import rates in vivo. *J Cell Biol* 2006; 175:579-93

32. Sugiyama Y, Kawabata I, Sobue K, Okabe S. Determination of absolute protein numbers in single synapses by a GFP-based calibration technique. *Nat Methods* 2005; 2:677-84

5 EQUIVALENTES Y ALCANCE

Los expertos en la técnica reconocerán o podrán determinar, usando no más que la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas descritas aquí. El alcance de la presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas.

10 Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o son de otro modo relevantes para un producto o proceso dado a menos que se indique lo contrario o sea de otro modo evidente por el contexto. La invención incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea, o es de otro modo relevante para un producto o proceso dado. La invención incluye realizaciones en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o de otro modo son relevantes para un producto o proceso dado.

15 Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo en formato de grupo Markush, debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se describe, y cualquier elemento o elementos pueden eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención, o los aspectos de la invención, se refieren como que comprenden elementos, características particulares, ciertas realizaciones de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características.

20 Cuando se dan intervalos, se incluyen los puntos finales. Además, debe entenderse que a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto y la comprensión de un experto en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir cualquier valor específico o subintervalo dentro de los intervalos señalados en diferentes realizaciones de la invención, a la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

25 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Cold Spring Harbor Laboratory

<120> REDUCCIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE ARNM CON MEDIACIÓN SIN SENTIDO

<130> C1300.70020WO00

30 <140> No asignado todavía

<141> 2014-09-04

<150> US 61/873,780

<151> 2013-09-04

<160> 268

35 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 1

gcagcttgtc acagt 15

<210> 2

45 <211> 15



<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
5 <400> 2  
tgcagcttgt cacag 15  
<210> 3  
<211> 15  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 3  
gtgcagcttg tcaca 15  
15 <210> 4  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 4  
cgtgcagctt gtcac 15  
<210> 5  
<211> 15  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 5  
30 acgtgcagct tgtca 15  
<210> 6  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 6

cacgtgcagc ttgtc 15  
 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 7  
 ccacgtgcag cttgt 15  
 10 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 8  
 tccacgtgca gcttg 15  
 <210> 9  
 <211> 15  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 9  
 25 atccacgtgc agctt 15  
 <210> 10  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 10  
 gatccacgtg cagct 15  
 <210> 11  
 35 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 11  
 ggatccacgt gcagc 15  
 5 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 12  
 aggatccacg tgca 15  
 <210> 13  
 <211> 15  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 13  
 20 caggatccac gtgca 15  
 <210> 14  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 14  
 tcaggatcca cgtgc 15  
 <210> 15  
 30 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 35 <400> 15  
 ctcaggatcc acgtg 15  
 <210> 16

<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 16  
tctcaggatc cacgt 15  
<210> 17  
<211> 15  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 17  
15 ttctcaggat ccacg 15  
<210> 18  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 18  
gttctcagga tccac 15  
<210> 19  
25 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
30 <400> 19  
agttctcagg atcca 15  
<210> 20  
<211> 15  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 20  
 cccagcagag cggcc 15  
 <210> 21  
 <211> 15  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 21  
 10 tcccagcaga gcggc 15  
 <210> 22  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 22  
 ttcccagcag agcgg 15  
 <210> 23  
 20 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 25 <400> 23  
 cttcccagca gagcg 15  
 <210> 24  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 24  
 acttcccagc agagc 15  
 35 <210> 25  
 <211> 15  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 25  
 5 tactcccag cagag 15  
 <210> 26  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 26  
 atactcca gcaga 15  
 <210> 27  
 15 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20 <400> 27  
 cactccc agcag 15  
 <210> 28  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 28  
 tcacttc cagca 15  
 30 <210> 29  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 29  
 atacttc ccagc 15

<210> 30  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 30  
 catcactt cccag 15  
 <210> 31  
 10 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 15 <400> 31  
 acatcact tcca 15  
 <210> 32  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 32  
 cacatcac ttcc 15  
 25 <210> 33  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 33  
 acacata ctcc 15  
 <210> 34  
 <211> 15  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 34  
 tacacatcat acttc 15  
 <210> 35  
 5 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10 <400> 35  
 atacacatca tactt 15  
 <210> 36  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 36  
 aatacacatc atact 15  
 20 <210> 37  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 37  
 aaatacacat catac 15  
 <210> 38  
 <211> 15  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 38  
 35 caaatacaca tcata 15  
 <210> 39  
 <211> 15



<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
5 <400> 39  
tcctccactg ttgca 15  
<210> 40  
<211> 15  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 40  
ttctccact gttgc 15  
15 <210> 41  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 41  
tttctccac tgttg 15  
<210> 42  
<211> 15  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 42  
30 ctttctcca ctggt 15  
<210> 43  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 43

gctttcctcc actgt 15  
 <210> 44  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 44  
 ggctttcctc cactg 15  
 10 <210> 45  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 45  
 aggctttcct ccact 15  
 <210> 46  
 <211> 15  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 46  
 25 aaggctttcc tccac 15  
 <210> 47  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 47  
 aaaggctttc ctcca 15  
 <210> 48  
 35 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 48  
caaaggcttt cctcc 15  
5 <210> 49  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
10 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 49  
ccaaggctt tcctc 15  
<210> 50  
<211> 15  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 50  
20 tcaaaggct tcct 15  
<210> 51  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
25 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 51  
ctcaaaggc ttcc 15  
<210> 52  
30 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
35 <400> 52  
actcaaagg ctctc 15  
<210> 53

<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 53  
cactccaaag gcttt 15  
<210> 54  
<211> 15  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 54  
15 tactccaaa ggctt 15  
<210> 55  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 55  
atcactccaa aggct 15  
<210> 56  
25 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
30 <400> 56  
tatcactcca aaggc 15  
<210> 57  
<211> 15  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 57  
 gtatcactcc aaagg 15  
 <210> 58  
 <211> 15  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 58  
 10 cttgatcact ccact 15  
 <210> 59  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 59  
 tcttgatcac tccac 15  
 <210> 60  
 20 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 25 <400> 60  
 ttcttgatca ctcca 15  
 <210> 61  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 61  
 tttcttgatc actcc 15  
 35 <210> 62  
 <211> 15  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 62  
5 atttcttgat cactc 15  
<210> 63  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 63  
tatttcttga tcact 15  
<210> 64  
15 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
20 <400> 64  
atatttcttg atcac 15  
<210> 65  
<211> 15  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 65  
catatttctt gatca 15  
30 <210> 66  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
35 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 66  
ccatatttct tgatc 15

<210> 67  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 67  
tccatatttc ttgat 15  
<210> 68  
10 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
15 <400> 68  
ttccatattt ctgga 15  
<210> 69  
<211> 15  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 69  
tttccatatt tcttg 15  
25 <210> 70  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 70  
cttccatat ttctt 15  
<210> 71  
<211> 15  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

<223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 71  
 actttccata ttct 15  
 <210> 72  
 5 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10 <400> 72  
 aactttccat attc 15  
 <210> 73  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 73  
 caactttcca tattt 15  
 20 <210> 74  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 74  
 gcaactttcc atatt 15  
 <210> 75  
 <211> 15  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 75  
 35 tgcaactttc catat 15  
 <210> 76  
 <211> 15



<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
5 <400> 76  
ctgcaacttt ccata 15  
<210> 77  
<211> 15  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 77  
ttcatcaagc agcaa 15  
15 <210> 78  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 78  
ggtcatcaag cagca 15  
<210> 79  
<211> 15  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 79  
30 gggtcatcaa gcagc 15  
<210> 80  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 80

gggttcatca agcag 15  
 <210> 81  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 81  
 tgggttcac aagca 15  
 10 <210> 82  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 82  
 ctgggttcac caagc 15  
 <210> 83  
 <211> 15  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 83  
 25 actgggttca tcaag 15  
 <210> 84  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 84  
 cactgggttc atcaa 15  
 <210> 85  
 35 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 85  
 gcactgggtt catca 15  
 5 <210> 86  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 86  
 agcactgggt tcatc 15  
 <210> 87  
 <211> 15  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 87  
 20 gagcactggg tcat 15  
 <210> 88  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 88  
 tgacactgg gtca 15  
 <210> 89  
 30 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 35 <400> 89  
 atgacactg ggffc 15  
 <210> 90

<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 90  
aatgagcact gggtt 15  
<210> 91  
<211> 15  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 91  
15 aaatgagcac tgggt 15  
<210> 92  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 92  
caaagagca ctggg 15  
<210> 93  
25 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
30 <400> 93  
ccaaatgagc actgg 15  
<210> 94  
<211> 15  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 94  
tccaaatgag cactg 15  
<210> 95  
<211> 15  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 95  
10 atccaaatga gcact 15  
<210> 96  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 96  
ttgcttctat cctgt 15  
<210> 97  
20 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
25 <400> 97  
attgcttcta tcctg 15  
<210> 98  
<211> 15  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 98  
cattgcttct atcct 15  
35 <210> 99  
<211> 15  
<212> ADN

# ES 2 779 302 T3

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 99  
5 gcattgcttc tatcc 15  
<210> 100  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 100  
agcattgctt ctatc 15  
<210> 101  
15 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
20 <400> 101  
cagcattgct tctat 15  
<210> 102  
<211> 15  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 102  
ccagcattgc ttcta 15  
30 <210> 103  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
35 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 103  
tccagcattg ctct 15

<210> 104  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 104  
ttccagcatt gcttc 15  
<210> 105  
10 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
15 <400> 105  
attccagcat tgctt 15  
<210> 106  
<211> 15  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 106  
cattccagca ttgct 15  
25 <210> 107  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 107  
gcattccagc attgc 15  
<210> 108  
<211> 15  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

<223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 108  
 ggcatccag cattg 15  
 <210> 109  
 5 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10 <400> 109  
 tggcattcca gcatt 15  
 <210> 110  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 110  
 ttggcattcc agcat 15  
 20 <210> 111  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 111  
 gttggcattc cagca 15  
 <210> 112  
 <211> 15  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 112  
 35 tgttggcatt ccagc 15  
 <210> 113  
 <211> 15



<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
5 <400> 113  
ttgttgcat tccag 15  
<210> 114  
<211> 15  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 114  
attgttgca ttcca 15  
15 <210> 115  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 115  
taggattctc tctag 15  
<210> 116  
<211> 15  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 116  
30 ctaggattct ctcta 15  
<210> 117  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 117

gctaggattc tctct 15  
 <210> 118  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 118  
 tgctaggatt ctctc 15  
 10 <210> 119  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 119  
 ctgctaggat tctct 15  
 <210> 120  
 <211> 15  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 120  
 25 tctgctagga ttctc 15  
 <210> 121  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 121  
 atctgctagg attct 15  
 <210> 122  
 35 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 122  
 gatctgctag gattc 15  
 5 <210> 123  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 123  
 agatctgcta ggatt 15  
 <210> 124  
 <211> 15  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 124  
 20 aagatctgct aggat 15  
 <210> 125  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 125  
 caagatctgc tagga 15  
 <210> 126  
 30 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 35 <400> 126  
 tcaagatctg ctagg 15  
 <210> 127

<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 127  
ctcaagatct gctag 15  
<210> 128  
<211> 15  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 128  
15 cctcaagatc tgcta 15  
<210> 129  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 129  
tcctcaagat ctgct 15  
<210> 130  
25 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
30 <400> 130  
ttcctcaaga tctgc 15  
<210> 131  
<211> 15  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 131  
 cttcctcaag atctg 15  
 <210> 132  
 <211> 15  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 132  
 10 tcttctcaa gatct 15  
 <210> 133  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 133  
 ttcttctca agatc 15  
 <210> 134  
 20 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 25 <400> 134  
 tgtgtaactg tgact 15  
 <210> 135  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 135  
 ctgtgtaact gtgac 15  
 35 <210> 136  
 <211> 15  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 136  
5 cctgtgtaac tgtga 15  
<210> 137  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 137  
gcctgtgtaa ctgtg 15  
<210> 138  
15 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
20 <400> 138  
agcctgtgta actgt 15  
<210> 139  
<211> 15  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 139  
tagcctgtgt aactg 15  
30 <210> 140  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
35 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 140  
ttagcctgtg taact 15

<210> 141  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 141  
cttagcctgt gtaac 15  
<210> 142  
10 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
15 <400> 142  
ccttagcctg tgtaa 15  
<210> 143  
<211> 15  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 143  
gccttagcct gtgta 15  
25 <210> 144  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 144  
tgccttagcc tgtgt 15  
<210> 145  
<211> 15  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 145  
ctgccttagc ctgtg 15  
<210> 146  
5 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
10 <400> 146  
gctgccttag cctgt 15  
<210> 147  
<211> 15  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 147  
agctgcctta gcctg 15  
20 <210> 148  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
25 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 148  
cagctgcctt agcct 15  
<210> 149  
<211> 15  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 149  
35 gcagctgcct tagcc 15  
<210> 150  
<211> 15



<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
5 <400> 150  
agcagctgcc ttagc 15  
<210> 151  
<211> 15  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 151  
cagcagctgc cttag 15  
15 <210> 152  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 152  
ccagcagctg cctta 15  
<210> 153  
<211> 15  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 153  
30 ccaaccactc ggagc 15  
<210> 154  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 154

gcccaaccact cggag 15  
 <210> 155  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 155  
 tgccaaccac tcgga 15  
 10 <210> 156  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 156  
 ctgccaacca ctcg 15  
 <210> 157  
 <211> 15  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 157  
 25 actgccaacc actcg 15  
 <210> 158  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 158  
 gactgccaac cactc 15  
 <210> 159  
 35 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 159  
 tgactgcaa cact 15  
 5 <210> 160  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 160  
 ttgactgcca accac 15  
 <210> 161  
 <211> 15  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 161  
 20 ttgactgcc aacca 15  
 <210> 162  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 162  
 gtttgactgc caacc 15  
 <210> 163  
 30 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 35 <400> 163  
 agtttgactg ccaac 15  
 <210> 164

<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 164  
aagtttgact gccaa 15  
<210> 165  
<211> 15  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 165  
15 gaagttgac tgcca 15  
<210> 166  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 166  
cgaagttga ctgcc 15  
<210> 167  
25 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
30 <400> 167  
ccgaagttg actgc 15  
<210> 168  
<211> 15  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 168  
 tccgaagttt gactg 15  
 <210> 169  
 <211> 15  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 169  
 10 gtccgaagtt tgact 15  
 <210> 170  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 170  
 agtccgaagt ttgac 15  
 <210> 171  
 20 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 25 <400> 171  
 gagtccgaag ttgga 15  
 <210> 172  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 172  
 ttgagttgct ccatc 15  
 35 <210> 173  
 <211> 15  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 173  
5 gttgagttgc tccat 15  
<210> 174  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 174  
tggtgagttg ctcca 15  
<210> 175  
15 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
20 <400> 175  
ttgttgagtt gctcc 15  
<210> 176  
<211> 15  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 176  
gttgttgagt tgctc 15  
30 <210> 177  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
35 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 177  
agttgttgag ttgct 15

<210> 178  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 178  
gagttgtga gttgc 15  
<210> 179  
10 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
15 <400> 179  
ggagttgtg agttg 15  
<210> 180  
<211> 15  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 180  
aggagttgtt gagtt 15  
25 <210> 181  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 181  
aaggagttgt tgagt 15  
<210> 182  
<211> 15  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

<223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 182  
 gaaggagttg ttgag 15  
 <210> 183  
 5 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10 <400> 183  
 ggaaggagt gttga 15  
 <210> 184  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 184  
 gggaaggagt tggg 15  
 20 <210> 185  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 185  
 agggaaggag ttggt 15  
 <210> 186  
 <211> 15  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 186  
 35 tagggaagga gttgt 15  
 <210> 187  
 <211> 15



<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
5 <400> 187  
ctaggaagg agttg 15  
<210> 188  
<211> 15  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 188  
actaggaag gagtt 15  
15 <210> 189  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 189  
aactaggaa ggagt 15  
<210> 190  
<211> 15  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 190  
30 gaactagga aggag 15  
<210> 191  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 191

agccgcaggg tcacc 15  
 <210> 192  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 192  
 cagccgcagg gtcac 15  
 10 <210> 193  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 193  
 gcagccgcag ggtca 15  
 <210> 194  
 <211> 15  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 194  
 25 cgagccgca gggtc 15  
 <210> 195  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 195  
 gcgcagccgc agggt 15  
 <210> 196  
 35 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 196  
cgcgagccg caggg 15  
5 <210> 197  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
10 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 197  
ccgagcagcc gcagg 15  
<210> 198  
<211> 15  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 198  
20 cccgagcagc cgcag 15  
<210> 199  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
25 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 199  
ccccgagcag ccgca 15  
<210> 200  
30 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
35 <400> 200  
acccgagca gccgc 15  
<210> 201

<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 201  
caccccgcgc agccg 15  
<210> 202  
<211> 15  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 202  
15 gcaccccgcg cagcc 15  
<210> 203  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 203  
ggcaccccgc gcagc 15  
<210> 204  
25 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
30 <400> 204  
gggcaccccg cgcag 15  
<210> 205  
<211> 15  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 205  
 actgctctgc cgtgg 15  
 <210> 206  
 <211> 15  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 206  
 10 aactgctctg ccgtg 15  
 <210> 207  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 207  
 gaactgctct gccgt 15  
 <210> 208  
 20 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 25 <400> 208  
 ggaactgctc tgccg 15  
 <210> 209  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 209  
 cggaactgct ctgcc 15  
 35 <210> 210  
 <211> 15  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 210  
 5      ccggaactgc tctgc    15  
       <210> 211  
       <211> 15  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
 10     <220>  
       <223> Oligonucleótido sintético  
       <400> 211  
       gccggaactg ctctg    15  
       <210> 212  
 15     <211> 15  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Oligonucleótido sintético  
 20     <400> 212  
       cgccggaact gctct    15  
       <210> 213  
       <211> 15  
       <212> ADN  
 25     <213> Secuencia artificial  
       <220>  
       <223> Oligonucleótido sintético  
       <400> 213  
       gcgccggaac tgctc    15  
 30     <210> 214  
       <211> 15  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
 35     <223> Oligonucleótido sintético  
       <400> 214  
       tgcgccgga ctgct    15

<210> 215  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
5 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 215  
atgcgccgga actgc 15  
<210> 216  
10 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
15 <400> 216  
catgcccgg aactg 15  
<210> 217  
<211> 15  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 217  
gcatgcccg gaact 15  
25 <210> 218  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
30 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 218  
cgcatgccc ggaac 15  
<210> 219  
<211> 15  
35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>

<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 219  
gcgcatgcgc cggaa 15  
<210> 220  
5 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
10 <400> 220  
cgcgcatgcg ccgga 15  
<210> 221  
<211> 15  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 221  
gcgcatgc gccgg 15  
20 <210> 222  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
25 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 222  
cgcgcatg cgccg 15  
<210> 223  
<211> 15  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 223  
35 ccgcatgc gcc 15  
<210> 224  
<211> 15



<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
5 <400> 224  
gcgcacacac gtgca 15  
<210> 225  
<211> 15  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 225  
cgcgcacaca cgtgc 15  
15 <210> 226  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
20 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 226  
gcgcgcacac acgtg 15  
<210> 227  
<211> 15  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 227  
30 ggcgcgacaca cacgt 15  
<210> 228  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
35 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 228

gggcgcgcac acacg 15  
<210> 229  
<211> 15  
<212> ADN  
5 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 229  
gggcggttc tcggg 15  
10 <210> 230  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
15 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 230  
cgggcggtt ctcgg 15  
<210> 231  
<211> 15  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 231  
25 ccagaccaga accag 15  
<210> 232  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
30 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 232  
accagaccag aacca 15  
<210> 233  
35 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 233  
 gaccagacca gaacc 15  
 5 <210> 234  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 234  
 cgaccagacc agaac 15  
 <210> 235  
 <211> 15  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 235  
 20 ccgaccagac cagaa 15  
 <210> 236  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 236  
 tccgaccaga ccaga 15  
 <210> 237  
 30 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 35 <400> 237  
 atccgaccag accag 15  
 <210> 238

<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
5 <223> Oligonucleótido sintético  
<400> 238  
catccgacca gacca 15  
<210> 239  
<211> 15  
10 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 239  
15 tcatccgacc agacc 15  
<210> 240  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 240  
ttcatccgac cagac 15  
<210> 241  
25 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
30 <400> 241  
gttcatccga ccaga 15  
<210> 242  
<211> 15  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 242  
tggtcatccg accag 15  
<210> 243  
<211> 15  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 243  
10 gtgtcatcc gacca 15  
<210> 244  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
15 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 244  
cgtgtcatc cgacc 15  
<210> 245  
20 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
25 <400> 245  
acgtgtcat cggac 15  
<210> 246  
<211> 15  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido sintético  
<400> 246  
cacgtgtca tccga 15  
35 <210> 247  
<211> 15  
<212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 247  
 5 ccacgtgtc atccg 15  
 <210> 248  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 248  
 cccacgtgtt catcc 15  
 <210> 249  
 15 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 20 <400> 249  
 gccacgtgt tcatac 15  
 <210> 250  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 250  
 aaggtcgatg gcttc 15  
 30 <210> 251  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 251  
 gaaggtcgat ggctt 15

<210> 252  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 252  
 tgaaggtcga tggct 15  
 <210> 253  
 10 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 15 <400> 253  
 ttgaaggtcg atggc 15  
 <210> 254  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 254  
 gttgaaggtc gatgg 15  
 25 <210> 255  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 30 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 255  
 ggttgaaggt cgatg 15  
 <210> 256  
 <211> 15  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

<223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 256  
 aggttgaagg tcgat 15  
 <210> 257  
 5 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 10 <400> 257  
 gaggttgaag gtcga 15  
 <210> 258  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 258  
 agaggttgaa ggtcg 15  
 20 <210> 259  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 259  
 aagaggttga aggtc 15  
 <210> 260  
 <211> 15  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 260  
 35 aaagaggttg aaggt 15  
 <210> 261  
 <211> 15



<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 5 <400> 261  
 caaagaggtt gaagg 15  
 <210> 262  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 262  
 acaaagaggt tgaag 15  
 15 <210> 263  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 263  
 cacaagagg ttgaa 15  
 <210> 264  
 <211> 15  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 264  
 30 acacaagag gttga 15  
 <210> 265  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 265

aacacaaaga ggttg      15  
 <210> 266  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 266  
 gaacacaaag aggtt      15  
 10 <210> 267  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 267  
 tgaacacaaa gaggt      15  
 <210> 268  
 <211> 15  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 <400> 268  
 25 ctgaacacaa agagg      15

**REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido antisentido (ASO) adecuado para uso en un método para inhibir, de manera específica de un gen, en una célula eucariota, la degradación con mediación sin sentido (NMD) de un ARNm, en el que:
  - 5 (a) dicho ARNm está codificado por un ácido nucleico que contiene un codón de terminación prematura (PTC) que causa una enfermedad o un PTC de origen natural;
  - (b) el ASO se hibrida con una región del ARNm que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón que (i) se encuentra en dirección 3' del PTC, y (ii) cuando se marca por el depósito de complejos de la unión de exones (EJC), marca el ARNm para la NMD; y
  - (c) el ASO inhibe el depósito del EJC en la unión exón-exón e inhibe la NMD del ARNm que contiene el PTC;
- 10 en el que el método comprende poner en contacto la célula eucariota con el ASO en condiciones en las que el ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en la unión exón-exón.
2. El ASO de la reivindicación 1, que es adecuado para uso en un método para aumentar, en una célula eucariota, la producción de una proteína truncada codificada por un gen que contiene un PTC.
3. El ASO de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que es adecuado para uso en un método para aumentar la
 15 eficacia de un fármaco de lectura, en el que dicho método comprende además la etapa de introducir en la célula eucariota una composición que promueva la lectura de PTC (un fármaco de lectura) en cantidad suficiente y en condiciones en las que la composición entra en la célula para dar como resultado cantidades de proteína de longitud completa traducida del ARNm que contiene el PTC superiores a las que se producirían en ausencia del ASO.
4. El ASO de la reivindicación 3, en el que el fármaco de lectura es ataluren o un aminoglicósido, por ejemplo en el
 20 que el aminoglicósido es amikacina, arbekacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, paromomicina, rodoestrepomicina, estreptomicina, tobramicina, apramicina, G418 (geneticina), lividomicina, o un análogo de aminoglicósido escogido de NB30, NB54, o NB84.
5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un ASO de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 25 6. El ASO de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para uso en un método de tratamiento de un individuo que tiene o tiene un mayor riesgo de tener una enfermedad causada por una mutación que introduce un PTC en un ARNm, produciendo así ARNm que contiene PTC, en el que el ASO inhibe la NMD del ARNm que contiene PTC.
7. El ASO de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o la composición farmacéutica de la reivindicación 5, para
 30 uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada con un PTC en un sujeto.
8. El ASO o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el PTC surge de una mutación en dicho sujeto.
9. El ASO o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en el que la enfermedad
 35 se selecciona de: síndrome de Rett, fibrosis quística,  $\beta$ -talasemia, CBAVD, distrofinopatía, y distrofia muscular de Duchenne/Becker.
10. El ASO o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que: (a) la enfermedad
 40 es  $\beta$ -talasemia, opcionalmente en el que la  $\beta$ -talasemia es causada por un alelo HBB que contiene una mutación terminadora seleccionada de CM810001, CM880039, CM034660, CM880040, o CM900122, y/o el ASO se selecciona de SEQ ID NO:1-19, por ejemplo SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16; o (b) la enfermedad es síndrome de Rett, opcionalmente síndrome de Rett causado por un alelo MECP2 que contiene una mutación terminadora seleccionada de CM060329, CM023409, HM971529, CM010332, CM057720, CM010333, CM035705, CM055984, o CM076290, y/o en el que el ASO se selecciona de SEQ ID NO:20-38, por ejemplo SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, o SEQ ID NO:32.
11. Un método para inhibir la NMD del ARNm de una manera específica de un gen en una célula eucariota *ex vivo*,
 45 que comprende: poner en contacto (a) una célula eucariota que comprende un ácido nucleico que contiene un PTC que causa una enfermedad, o un PTC de origen natural, y ARNm codificado por ácido nucleico, con (b) un ASO que se hibrida con una región del ARNm que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón que (i) se encuentra en dirección 3' del PTC, y (ii) cuando está marcada por depósito de EJC, marca el ARNm para la degradación con mediación sin sentido, en condiciones en las que el ASO entra en la célula
 50 en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en la unión exón-exón e inhibir la NMD del ARNm que contiene el PTC.
12. Un método para inhibir el depósito de EJC de una manera específica de un gen en una célula eucariota *ex vivo*, que comprende:

(a) identificar una unión exón-exón que está (i) en dirección 3' de un PTC que causa una enfermedad o de origen natural en el ARNm transcrito en la célula eucariota, y (ii) que está unida por un EJC que identifica el ARNm para la NMD; y

5 (b) introducir en la célula un ASO específico para el ARNm de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de la unión exón-exón identificado en (a), en cantidad suficiente y en condiciones en las que el ASO bloquea la unión o depósito de EJC a la unión exón-exón.

13. Un método para aumentar la cantidad de una proteína truncada codificada por un gen que contiene un PTC, cuando la proteína se produce en una célula eucariota *ex vivo*, que comprende:

10 (a) identificar una unión exón-exón que está en dirección 3' de un PTC que causa una enfermedad o un PTC de origen natural en el ARNm transcrito en la célula eucariota; y

15 (b) introducir en la célula eucariota un ASO específico de una región del ARNm que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón identificada en (a), y para el que el depósito de EJC marca el ARNm para degradación con mediación sin sentido, en condiciones bajo las cuales el ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en dirección 5' de la unión exón-exón e inhibir la NMD del ARNm que contiene el PTC, y se produce la producción de proteínas.

14. Un método para aumentar la eficacia de un fármaco de lectura, opcionalmente un fármaco de lectura como se define en la reivindicación 4, que comprende:

20 (a) identificar una unión exón-exón que está en dirección 3' de un PTC que causa una enfermedad o de origen natural en ARNm transcrito en una célula eucariota;

(b) introducir en la célula eucariota *ex vivo* un ASO específico de una región del ARNm que está de alrededor de 1 a alrededor de 50 nucleótidos en dirección 5' de la unión exón-exón identificada en (a), para el que el depósito de EJC marca el ARNm para degradación con mediación sin sentido, en condiciones en las que (i) el ASO entra en la célula en cantidad suficiente para inhibir el depósito de EJC en la unión exón-exón e inhibir la NMD del ARNm que contiene el PTC, y (ii) se produce la producción de proteínas; y

25 (c) introducir en la célula eucariota *ex vivo* dicho fármaco de lectura en cantidad suficiente y en condiciones en las que entra en la célula para dar como resultado cantidades de proteína de longitud completa traducida del ARNm que contiene el PTC superiores que las que se producirían en ausencia de ASO introducido en (b).

30 15. El ASO de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, la composición farmacéutica de la reivindicación 5, el ASO o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con las reivindicaciones 6-10, o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en los que: (a) el PTC causante de enfermedad resulta de una mutación; (b) el ASO es específico de una región del ácido nucleico que está de alrededor de 20 a alrededor de 24 nucleótidos en dirección 5' de una unión exón-exón; (c) el ASO tiene no menos de 14 nucleótidos de longitud; (d) el ácido nucleico es, o el ARNm se transcribe de, un alelo HBB que contiene una mutación terminadora, opcionalmente en los que: (i) el alelo HBB es CM810001, CM880039, CM034660, CM880040, o CM900122; y/o (ii) el ASO se selecciona de SEQ ID NO:1-19, por ejemplo SEQ ID NO:15 o SEQ ID NO:16; (e) el ácido nucleico es, o el ARNm se transcribe de, un alelo MECP2 que contiene una mutación terminadora, opcionalmente en los que: (i) el alelo MECP2 es CM060329, CM023409, HM971529, CM010332, CM057720, CM010333, CM035705, CM055984, o CM076290; y/o (ii) el ASO se selecciona de SEQ ID NOs:20-38, por ejemplo se selecciona de SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, o SEQ ID NO:32; (f) la célula eucariota está en un individuo, por ejemplo en un ser humano; y/o (g) en los que el ASO entra en el núcleo de la célula y se inhibe la NMD del ARNm en el núcleo.

35

40

FIG. 1

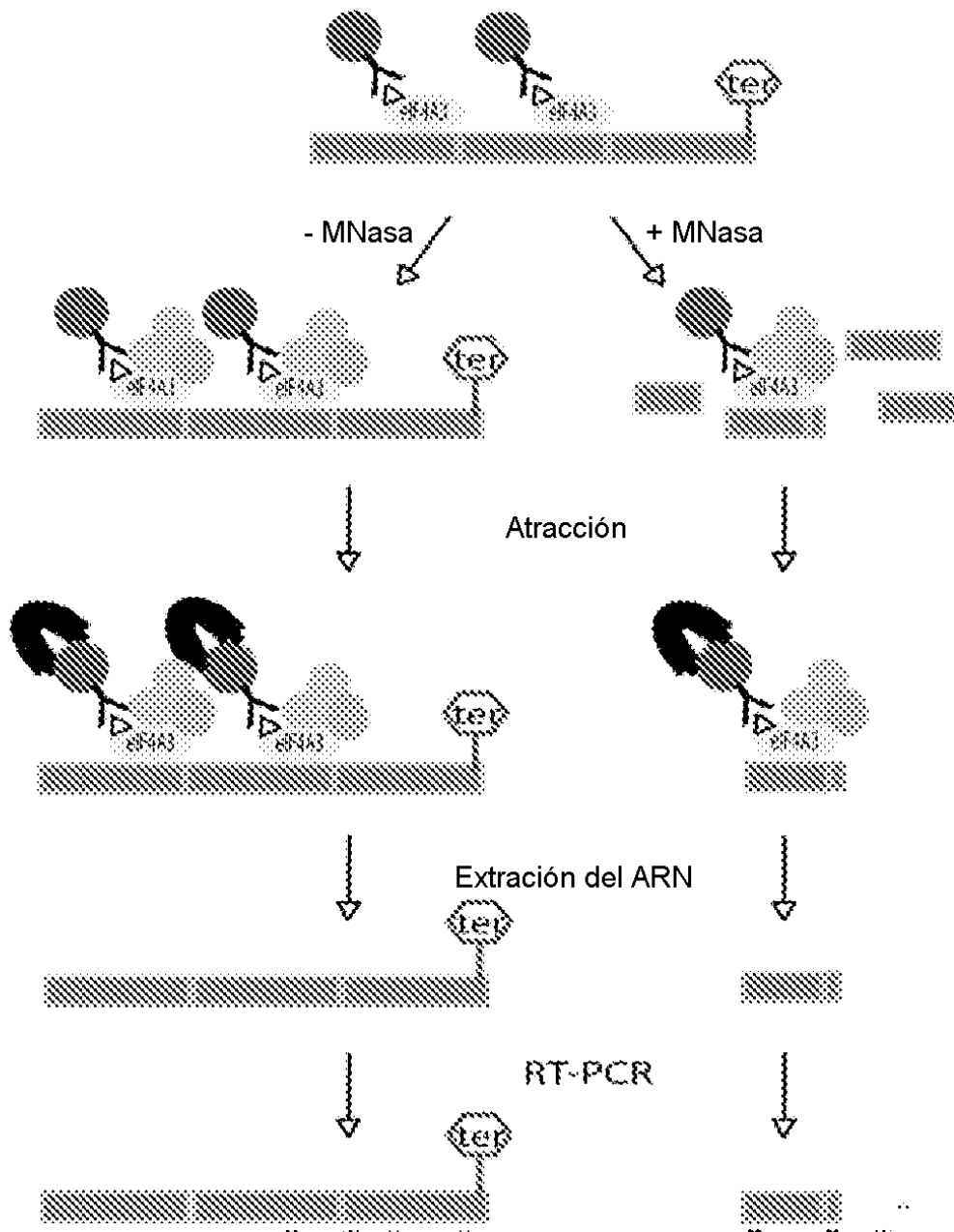


FIG 2

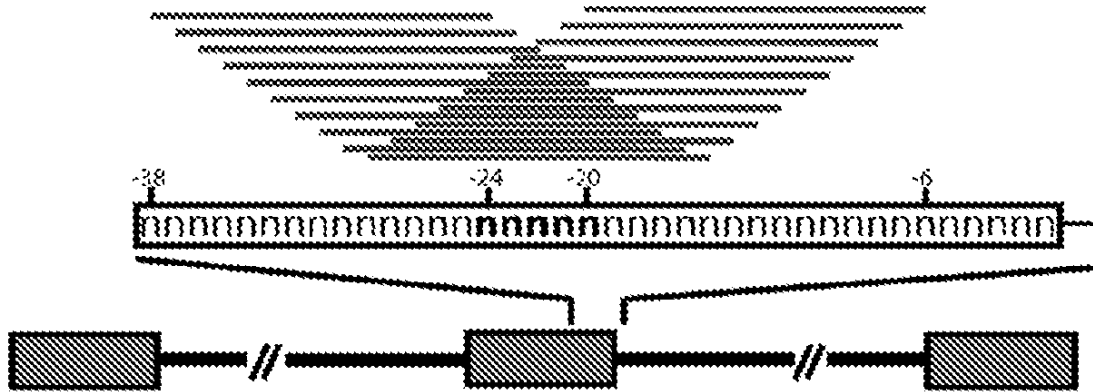


FIG. 3

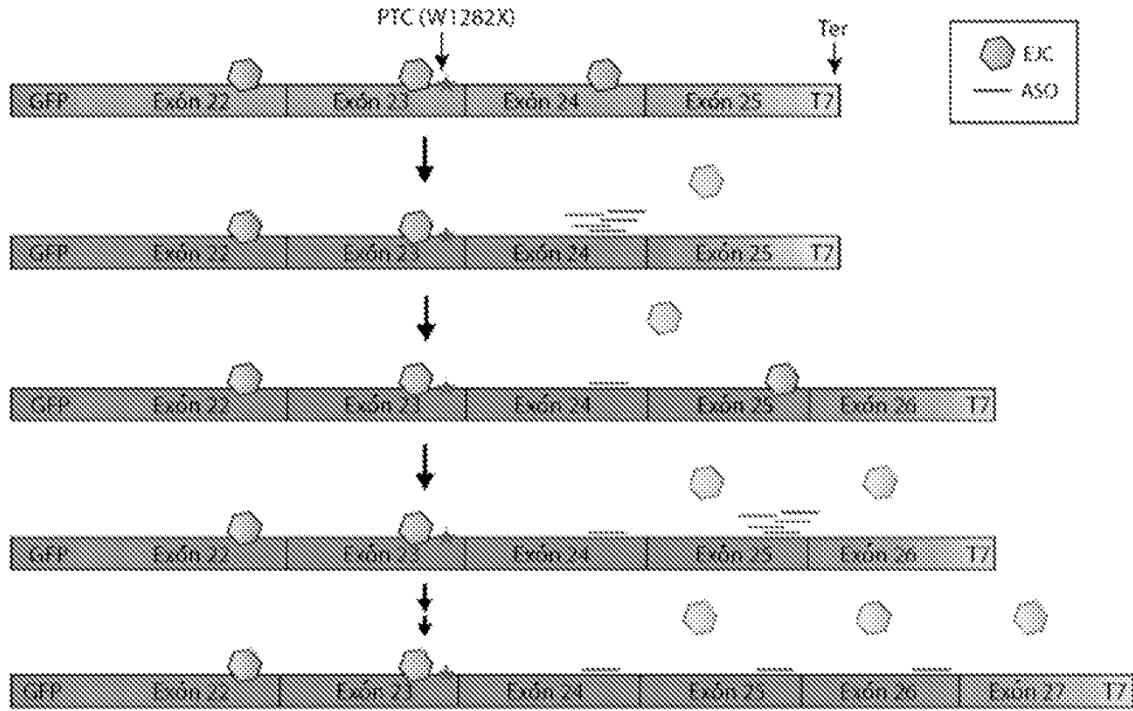
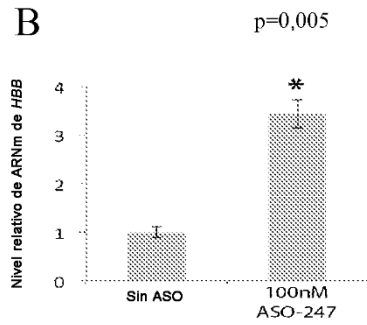


FIG. 4

A

% Tipo salvaje	T39 tratado con ASO																			
	WT	Sin ASO	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251
	100	60	48	28	28	22	10	2	1	1	3	6	50	52	73	91	68	48	57	64

B



C

Nº de veces de cambio HBB-T39	Sin ASO	ASO-247
	1,0	6,0



FIG. 5

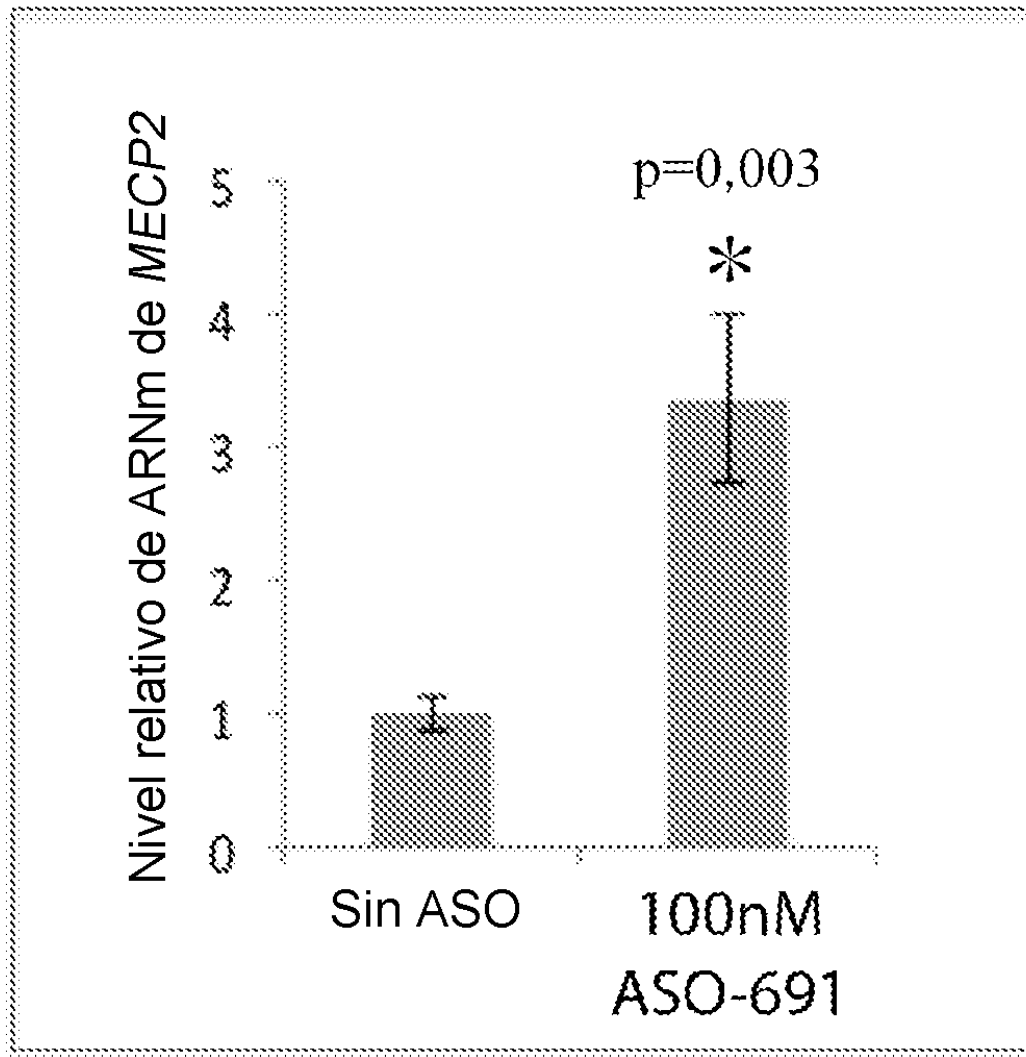


FIG. 6A



Nº de veces de cambio							+ASO-479 (50nM+50nM)					
	492	493	501	502	503	504	492	492	501	502	503	504
	2,0	2,0	0,8	1,4	1,4	2,0	1,4	1,4	1,0	1,8	1,6	1,9

FIG. 6B

↓ ASOs individuales usados para seleccionar como diana el EJC en dirección 3' (dEJC) respectivo

