

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 679**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2014 PCT/US2014/068225**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.06.2015 WO15084884**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2014 E 14867872 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3077510**

54 Título: **Compuestos antisentido y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**02.12.2013 US 201361910871 P**

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

**03.12.2020**

73 Titular/es:

**IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)  
2855 Gazelle Court  
Carlsbad, CA 92010, US y  
ROSALIND FRANKLIN UNIVERSITY OF  
MEDICINE AND SCIENCE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RIGO, FRANK y  
HASTINGS, MICHELLE, L.**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 797 679 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

Compuestos antisentido y usos de los mismos

## 5 ANTECEDENTES

La lipofuscinosis ceroide neuronal juvenil (JNCL), también conocida como enfermedad de Batten, es el trastorno más común de NCL, un grupo de enfermedades neurodegenerativas infantiles. El JNCL ocurre en aproximadamente 1 de cada 25.000 nacimientos en los Estados Unidos y Europa y se ha informado en muchos otros países del mundo. El inicio ocurre entre los cinco y los ocho años y los síntomas incluyen pérdida progresiva de la función motora, convulsiones, pérdida de visión y pérdida de la función cognitiva, lo que resulta en la muerte antes de los 30 años. El JNCL es un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones del gen CLN3. Hay cuarenta y nueve mutaciones conocidas de CLN3, pero aproximadamente el 80% de los casos de JNCL resultan de una eliminación particular del gen CLN3 que abarca los exones 7 y 8 (*CLN3Δ78*). La eliminación de *CLN3Δ78* provoca un desplazamiento de marco que da como resultado un codón de parada prematuro en el exón 9. El producto proteico truncado de *CLN3Δ78* es el 33% de la longitud del tipo salvaje. La función de la proteína CLN3 no se comprende bien, pero está implicada en muchos procesos importantes, p. ej., el tráfico de membranas, la distribución de fosfolípidos y la respuesta al estrés oxidativo. Actualmente, no hay tratamientos para ninguno de los trastornos de NCL, y las opciones de los pacientes se limitan al tratamiento correctivo de los síntomas (*ver Bennett y Rakheja, Dev. Disabil. Res. Rev.* 2013, 17, 254-259).

Los compuestos antisentido se han utilizado para modular los ácidos nucleicos diana. Se han informado compuestos antisentido que comprenden una variedad de modificaciones químicas y motivos. En ciertos casos, dichos compuestos son útiles como herramientas de investigación, reactivos de diagnóstico y como agentes terapéuticos. En ciertos casos, se ha demostrado que los compuestos antisentido modulan la expresión de proteínas al unirse a un ARN mensajero diana (ARNm) que codifica la proteína. En ciertos casos, dicha unión de un compuesto antisentido a su ARNm diana da como resultado la escisión del ARNm. También se han informado compuestos antisentido que modulan el procesamiento de un pre-ARNm. Tales compuestos antisentido alteran el empalme, interfieren con la poliadenilación o evitan la formación de la tapa 5' de un pre-ARNm.

Ciertos compuestos antisentido se han descrito previamente. Véase, p. ej., la Patente de EE.UU. Nº 7,399,845 y la Solicitud de Patente Internacional publicada Nº WO 2008/049085.

El documento WO 2013/066438 describe la evaluación y la mejora de la especificidad de escisión de nucleasa de nucleasas modificadas (p. ej., nucleasas de dedo de zinc, nucleasas efectoras de tipo activador transcripcional, etc.

Svetlana N. Rylova et al. (2002) describe los efectos de bloquear la expresión de la proteína CLN3 en el crecimiento de células cancerosas, supervivencia, producción de ceramida y apoptosis mediante el uso de una construcción CLN3 antisentido portadora de adenovirus.

## 40 RESUMEN

La invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consta de 8 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobase que comprende una región complementaria, en la que la región complementaria comprende al menos 8 nucleobases contiguas y es 100% complementario a una porción de igual longitud de una región diana de una transcripción CLN3, en la que:

- 50 (i) la secuencia de nucleobase del oligonucleótido es al menos 90% complementaria a una región de igual longitud de la transcripción de CLN3, medida a lo largo de toda la longitud del oligonucleótido; y  
(ii) el oligonucleótido modificado no comprende más de 4 2'-desoxinucleósidos contiguos no modificados; y

en donde el compuesto es capaz de inducir la omisión de uno o más exones de la transcripción de CLN3, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Batten o para retrasar o prevenir la aparición de la enfermedad de Batten.

55 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consta de 8 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobase que comprende una región complementaria, en la que la región complementaria comprende al menos 8 nucleobases contiguas y es 100% complementaria a una porción de igual longitud de una región diana de una transcripción CLN3, en donde:

- 60 (i) la secuencia de nucleobase del oligonucleótido es al menos 90% complementaria a una región de igual longitud de la transcripción de CLN3, medida a lo largo de toda la longitud del oligonucleótido; y  
(ii) el oligonucleótido modificado no comprende más de 4 2'-desoxinucleósidos contiguos no modificados; y

65 en donde el compuesto es capaz de inducir la omisión de uno o más exones de la transcripción de CLN3, y un vehículo

o diluyente farmacéuticamente aceptable, para usar en el tratamiento de la enfermedad de Batten o para retrasar o prevenir la aparición de enfermedades de Batten

5 Muchos casos de JNCL resultan de una supresión particular del gen CLN3 que abarca los exones 7 y 8 (*CLN3Δ78*). La eliminación de *CLN3Δ78* provoca un desplazamiento de marco que da como resultado un codón de parada prematuro en el exón 9. El producto proteico truncado de *CLN3Δ78* es el 33% de la longitud del tipo salvaje. En ciertas realizaciones, la proteína *CLN3Δ78* truncada causa una variedad de defectos celulares, incluyendo disfunción lisosómica y transportadora. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados dirigidos al pre-ARNm de CLN3 pueden inducir la omisión de uno o más exones y, por lo tanto, evitan el desplazamiento del marco que da como resultado un codón de parada prematuro en el exón 9.

15 P. ej., en ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados dirigidos al preARN CLN3 del exón 6 pueden inducir la omisión en el exón 6 y evitar el reconocimiento del codón de parada prematuro en el exón 9, produciendo así una proteína CLN3 truncada que tiene una funcionalidad restaurada en comparación con la isoforma *CLN3Δ78*. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados dirigidos al pre-ARNm de CLN3 del exón 9 pueden inducir la omisión en el exón 9 y evitar el reconocimiento del codón de detención prematuro en el exón 9, produciendo así una proteína CLN3 truncada que tiene una funcionalidad restaurada en comparación con la isoforma CLN3A 78.

20 En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona compuestos que comprenden oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, dichos oligonucleótidos son complementarios a una lipofuscinosis ceroide, transcripción neuronal 3 ("CLN3"). En ciertas realizaciones de este tipo, los oligonucleótidos son complementarios a una región diana de la transcripción de CLN3 que comprende el exón 6. En ciertas de tales realizaciones, los oligonucleótidos son complementarios a una región diana de la transcripción de CLN3 que comprende un intrón adyacente al exón 6.

25 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son complementarios a una región diana del transcrito CLN3 que comprende un intrón adyacente al exón 6 y corriente abajo del exón 6. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son complementarios a una región diana del transcrito CLN3 que comprende un intrón adyacente al exón 6 y corriente arriba del exón 6.

30 En ciertas realizaciones de este tipo, los oligonucleótidos son complementarios a una región diana de la transcripción de CLN3 que comprende el exón 9. En ciertas de tales realizaciones, los oligonucleótidos son complementarios a una región diana de la transcripción de CLN3 que comprende un intrón adyacente al exón 9. En ciertas de tales realizaciones, oligonucleótidos son complementarios a una región diana de la transcripción CLN3 que comprende un intrón adyacente al exón 9 y corriente abajo del exón 9. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son complementarios a una región diana de la transcripción CLN3 que comprende un intrón adyacente al exón 9 y corriente arriba del exón 9.

40 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos promueven la omisión del exón 6. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos promueven la omisión del exón 6 de un transcrito *CLN3Δ78*. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos promueven la omisión del exón 9. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos promueven la omisión del exón 9 de un transcrito *CLN3Δ78*.

45 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos promueven la omisión de los exones 6, 7 y 8. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos promueven la omisión de los exones 7, 8 y 9. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos promueven la omisión del exón 6. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos promueven la omisión del exón 9.

En ciertas realizaciones, la transcripción de CLN3 está en un ser humano. En ciertas realizaciones, la transcripción de CLN3 está en un ratón.

50 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 es un esquema del ARN WT CLN3 humano y el ARN y proteínas de *CLN3Δ78* mutante. Los productos de empalme, CLN3Δ678 y CLN3Δ789, también se representan. Los exones se representan como cuadros, los intrones se representan como líneas. En ciertas realizaciones, los ASO se usan para alterar el empalme del pre-ARNm de CLN3Δ78.

La Figura 2 muestra los productos de empalme producidos después del tratamiento de fibroblastos CLT3A78 mutantes heterocigotos y homocigotos WT, con un ASO dirigido al exón 6 de CLN3 y análisis por RT-PCR.

60 La Figura 3 muestra productos de empalme producidos después del tratamiento de fibroblastos CLN3Δ78 mutantes homocigotos con concentraciones variables de un ASO dirigido al exón 6 de CLN3 y análisis por RT-PCR.

La Figura 4 muestra una transferencia Western que ilustra los productos proteicos producidos después del tratamiento de fibroblastos CLN3Δ78 mutantes homocigotos WT, con un ASO dirigido al exón 6 y un ASO de control.

65 La Figura 5 muestra los resultados de RT-PCR de un cribado de ASO dirigidos al exón 6 del ratón CLN3.

La Figura 6 muestra los resultados de RT-PCR de un cribado de ASO dirigidos al exón 9 de CLN3 de ratón.

La Figura 7 muestra los productos de empalme producidos después del tratamiento de los ratones Batten de CLN3Δ78 mutante homocigoto con un ASO dirigido al exón 6 de CLN3 (616709) o un ASO de control y análisis por RT-PCR.

La Figura 8 muestra los resultados de RT-PCR de un cribado de ASO dirigidos al exón 6 de CLN3 humano.

La Figura 9 muestra los resultados de RT-PCR de un cribado de ASO dirigidos al exón 9 de CLN3 humano.

La Figura 10 muestra los productos de empalme producidos después del tratamiento de fibroblastos CLN3Δ78 mutantes homocigotos con ASO dirigidos al exón 6 o al exón 9 de CLN3 humano.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para la síntesis química y el análisis químico. Ciertas técnicas y procedimientos de este tipo pueden encontrarse, p. ej., en "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" Editado por Sangvi y Cook, American Chemical Society, Washington DC, 1994; "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., 21ª edición, 2005; y "Antisense Drug Technology, Principles, Strategies and Applications" Editado por Stanley T. Crooke, CRC Press, Boca Raton, Florida; y Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual," 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados: Como se usa en el presente documento, "nucleósido" significa un compuesto que comprende un resto nucleobase y un resto azúcar. Los nucleósidos incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos naturales (como se encuentran en el ADN y el ARN) y nucleósidos modificados. Los nucleósidos pueden estar unidos a un resto fosfato.

Como se usa en el presente documento, "modificación química" significa una diferencia química en un compuesto en comparación con una contraparte natural. En referencia a un oligonucleótido, la modificación química no incluye diferencias solo en la secuencia de nucleobase. Las modificaciones químicas de los oligonucleótidos incluyen modificaciones de nucleósidos (incluidas modificaciones de restos de azúcar y modificaciones de nucleobases) y modificaciones de enlaces internucleosídicos.

Como se usa en el presente documento, "furanosilo" significa una estructura que comprende un anillo de 5 miembros que comprende cuatro átomos de carbono y un átomo de oxígeno.

Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar natural" significa un ribofuranosilo como se encuentra en el ARN natural o un desoxirribofuranosilo como se encuentra en el ADN natural.

Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar" significa un resto de azúcar natural o un resto de azúcar modificado de un nucleósido.

Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar modificado" significa un resto de azúcar sustituido, un resto de azúcar bicíclico o tricíclico, o un sustituto de azúcar.

Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar sustituido" significa un furanosilo que comprende al menos un grupo sustituyente que difiere de un resto de azúcar natural. Los restos de azúcar sustituidos incluyen, pero no se limitan a furanosilos que comprenden sustituyentes en la posición 2', la posición 3', la posición 5' y/o la posición 4'.

Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar sustituido en 2'" significa un furanosilo que comprende un sustituyente en la posición 2' distinto de H u OH. A menos que se indique lo contrario, un resto de azúcar sustituido en 2' no es un resto de azúcar bicíclico (es decir, el sustituyente 2' de un resto de azúcar sustituido en 2' no forma un puente hacia otro átomo del anillo de furanosilo).

Como se usa en este documento, "MOE" significa -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

Como se usa en el presente documento, "resto de azúcar bicíclico" significa un resto de azúcar modificado que comprende un anillo de 4 a 7 miembros (que incluye pero no se limita a un furanosilo) que comprende un puente que conecta dos átomos del anillo de 4 a 7 miembros para formar un segundo anillo, dando como resultado en una estructura bicíclica. En ciertas realizaciones, el anillo de 4 a 7 miembros es un anillo de azúcar. En ciertas realizaciones, el anillo de 4 a 7 miembros es un furanosilo. En ciertas realizaciones de este tipo, el puente conecta el carbono 2' y el carbono 4' del furanosilo.

Como se usa en el presente documento, el término "sustituto del azúcar" significa una estructura que no comprende un furanosilo y que es capaz de reemplazar el resto de azúcar natural de un nucleósido, de modo que el nucleósido resultante es capaz de (1) incorporación en un oligonucleótido y (2) hibridación a un nucleósido complementario. Dichas estructuras incluyen anillos que comprenden un número diferente de átomos que el furanosilo (p. ej., anillos de 4, 6 o 7 miembros); reemplazo del oxígeno de un furanosilo con un átomo que no es de oxígeno (p. ej., carbono, azufre o nitrógeno); o tanto un cambio en el número de átomos como un reemplazo del oxígeno. Dichas estructuras también pueden comprender sustituciones correspondientes a las descritas para restos de azúcar sustituidos (p. ej., sustitutos de azúcar carbocíclico bicíclico de 6 miembros que opcionalmente comprenden sustituyentes adicionales). Los sustitutos del azúcar también incluyen reemplazos de azúcar más complejos (p. ej., los sistemas sin anillo del ácido nucleico peptídico). Los sustitutos del azúcar incluyen, sin limitación, morfolino, morfolinos modificados, ciclohexenilos y ciclohexitoles.

Como se usa en el presente documento, "nucleótido" significa un nucleósido que comprende además un grupo de enlace fosfato. Como se usa en el presente documento, los "nucleósidos unidos" pueden o no estar unidos por enlaces fosfato y, por lo tanto, incluyen, pero no se limitan a, "nucleótidos unidos". Como se usa en el presente documento, "nucleósidos unidos" son nucleósidos que están conectados en una secuencia continua (es decir, no hay nucleósidos adicionales presentes entre los que están unidos).

Como se usa en el presente documento, "nucleobase" significa un grupo de átomos que pueden unirse a un resto de azúcar para crear un nucleósido que sea capaz de incorporarse a un oligonucleótido, y en donde el grupo de átomos sea capaz de unirse con una nucleobase complementaria de origen natural de otro oligonucleótido o ácido nucleico. Las nucleobases pueden ser de origen natural o pueden modificarse.

Como se usa en el presente documento, "base heterocíclica" o "nucleobase heterocíclica" significa una nucleobase que comprende una estructura heterocíclica.

Como se usa en el presente documento, los términos "nucleobase no modificada" o "nucleobase natural" significan las nucleobases heterocíclicas naturales de ARN o ADN: las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) (incluyendo 5-metilo C) y uracilo (U).

Como se usa en el presente documento, "nucleobase modificada" significa cualquier nucleobase que no es una nucleobase natural.

Como se usa en el presente documento, "nucleósido modificado" significa un nucleósido que comprende al menos una modificación química en comparación con los nucleósidos de ARN o ADN de origen natural. Los nucleósidos modificados comprenden un resto de azúcar modificado y/o una nucleobase modificada.

Como se usa en el presente documento, "nucleósido bicíclico" o "BNA" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar bicíclico.

Como se usa en este documento, "nucleósido de etilo restringido" o "cEt" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'.

Como se usa en el presente documento, "nucleósido de ácido nucleico bloqueado" o "LNA" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'.

Como se usa en el presente documento, "nucleósido sustituido en 2'" significa un nucleósido que comprende un sustituyente en la posición 2' distinta de H u OH. A menos que se indique lo contrario, un nucleósido sustituido en 2' no es un nucleósido bicíclico.

Como se usa en el presente documento, "2'-desoxinucleósido" significa un nucleósido que comprende un resto de azúcar furanosilo 2'-H, como se encuentra en los desoxirribonucleósidos (ADN) de origen natural. En ciertas realizaciones, un 2'-desoxinucleósido puede comprender una nucleobase modificada o puede comprender una nucleobase de ARN (p. ej., uracilo).

Como se usa en el presente documento, "oligonucleótido" significa un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos no modificados (ARN) y/o desoxirribonucleósidos no modificados (ADN) y/o uno o más nucleósidos modificados.

Como se usa en el presente documento "oligonucleósido" significa un oligonucleótido en donde ninguno de los enlaces internucleosídicos contiene un átomo de fósforo. Como se usa en el presente documento, los oligonucleótidos incluyen oligonucleósidos.

Como se usa en el presente documento, "oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende al menos un nucleósido modificado y/o al menos un enlace internucleósido modificado.

Como se usa en el presente documento, "enlace internucleosídico" significa un enlace covalente entre nucleósidos adyacentes en un oligonucleótido.

5 Como se usa en el presente documento, "enlace internucleosídico natural" significa un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

Como se usa en el presente documento, "enlace internucleosídico modificado" significa cualquier enlace internucleosido distinto de un enlace internucleosido natural.

10 Como se usa en el presente documento, "compuesto oligomérico" significa una estructura polimérica que comprende dos o más subestructuras. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico comprende un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico comprende uno o más grupos conjugados y/o grupos terminales. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico consiste en un oligonucleótido.

15 Como se usa en el presente documento, "grupo terminal" significa uno o más átomos unidos a uno o ambos extremos, el extremo 3' o el extremo 5' de un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un grupo terminal es un grupo conjugado. En ciertas realizaciones, un grupo terminal comprende uno o más nucleósidos del grupo terminal.

20 Como se usa en el presente documento, "conjugado" significa un átomo o grupo de átomos unidos a un oligonucleótido o compuesto oligomérico. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto al que están unidos, incluidas, entre otras, propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas, de unión, absorción, distribución celular, absorción celular, carga y/o eliminación.

25 Como se usa en el presente documento, "grupo de enlace conjugado" significa cualquier átomo o grupo de átomos usado para unir un conjugado a un oligonucleótido o compuesto oligomérico.

Como se usa en el presente documento, "compuesto antisentido" significa un compuesto que comprende o que consiste en un oligonucleótido al menos una porción del cual es complementario a un ácido nucleico diana al que es capaz de hibridarse, dando como resultado al menos una actividad antisentido.

30 Como se usa en el presente documento, "actividad antisentido" significa cualquier cambio detectable y/o medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido a su ácido nucleico diana. Como se usa en el presente documento, "detectar" o "medir" significa que se realiza una prueba o ensayo para detectar o medir. Dicha detección y/o medición puede dar como resultado un valor de cero. Por lo tanto, si una prueba de detección o medición resulta en un hallazgo de ausencia de actividad (actividad de cero), no obstante, se ha realizado el paso de detectar o medir la actividad.

35 Como se usa en el presente documento, "actividad detectable y/o medible" significa una actividad estadísticamente significativa que no es cero.

40 Como se usa en el presente documento, "esencialmente sin cambios" significa poco o ningún cambio en un parámetro particular, particularmente en relación con otro parámetro que cambia mucho más. En ciertas realizaciones, un parámetro esencialmente no cambia cuando cambia menos del 5%. En ciertas realizaciones, un parámetro esencialmente no cambia si cambia menos de dos veces mientras que otro parámetro cambia al menos diez veces. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, una actividad antisentido es un cambio en la cantidad de un ácido nucleico diana. En ciertas de tales realizaciones, la cantidad de un ácido nucleico no diana esencialmente no cambia si cambia mucho menos que el ácido nucleico diana, pero el cambio no necesita ser cero.

50 Como se usa en el presente documento, "expresión" significa el proceso por el cual un gen finalmente da como resultado una proteína. La expresión incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripcional (p. ej., empalme, poliadenilación, adición de 5'-tapa) y traducción.

Como se usa en el presente documento, "ácido nucleico diana" significa una molécula de ácido nucleico con la que se hibrida un compuesto antisentido.

55 Como se usa en el presente documento, "ARNm" significa una molécula de ARN que codifica una proteína.

Como se usa en el presente documento, "pre-ARNm" significa una transcripción de ARN que no se ha procesado completamente en ARNm. Pre-ARN incluye uno o más intrones.

60 Como se usa en el presente documento, "transcripción" significa una molécula de ARN transcrita a partir de ADN. Las transcripciones incluyen, pero no están limitadas a ARNm, pre-ARNm y ARN parcialmente procesado.

Como se usa en este documento, "CLN3" significa lipofuscinosis ceroides, neuronal 3.

65 Como se usa en el presente documento, "transcripción de CLN3" significa una transcripción transcrita a partir de un gen CLN3. En ciertas realizaciones, una transcripción de CLN3 comprende la SEQ ID NO:1: el complemento del

número de acceso GENBANK NT\_010393,16 truncado de los nucleótidos 28427600 a 28444620. En ciertas realizaciones, una transcripción de CLN3 comprende la SEQ ID NO: 2: el complemento del número de acceso GENBANK NT 039433,8, truncada de los nucleótidos 44319075 a 44333955.

5 Como se usa en el presente documento, "gen CLN3" significa un gen que codifica una lipofuscinosis ceroides, proteína 3 neuronal y cualquier lipofuscinosis ceroides, isoformas de proteína 3 neuronal. En ciertas realizaciones, un gen CLN3 está representado por el número de acceso GENBANK NT\_010393,16 truncado de los nucleótidos 28427600 a 28444620, o una variante del mismo. En ciertas realizaciones, un gen CLN3 es al menos 95% idéntico a número de acceso GENBANK NT\_010393,16 truncado de los nucleótidos 28427600 a 28444620. En ciertas realizaciones, un gen CLN3 es al menos 90% idéntico al número de acceso GENBANK NT 010393,16 truncado de los nucleótidos 28427600 a 28444620. En ciertas realizaciones, un gen CLN3 está representado por GENBANK número 10 NT\_039433,8, truncado de los nucleótidos 44319075 a 44333955, o una variante de los mismos. En ciertas realizaciones, un gen CLN3 es al menos 95% idéntico al número de acceso GENBANK NT 039433,8, truncado de los nucleótidos 44319075 a 44333955. En ciertas realizaciones, un gen CLN3 es al menos 90% idéntico al número de acceso GENBANK NT 039433,8, truncado de los nucleótidos 44319075 a 44333955. En ciertas realizaciones, un gen CLN3 codifica una proteína CLN3 de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, un gen CLN3 codifica una proteína 15 *CLN3Δ78*.

20 Como se usa en el presente documento, "*CLV3A7S*" significa un gen CLN3 que tiene una delección que abarca la totalidad o parte de los exones 7 y 8. En ciertas realizaciones, la delección *CLN3Δ78* provoca un desplazamiento de trama que da como resultado un codón de parada prematuro en el exón 9. En ciertas realizaciones, el producto proteico truncado de *CLN3Δ78* es 33% de la longitud del tipo salvaje.

25 Como se usa en el presente documento, "direccionamiento" o "dirigido a" significa la asociación de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico diana particular o una región particular de una molécula de ácido nucleico diana. Un compuesto antisentido se dirige a un ácido nucleico diana si es suficientemente complementario al ácido nucleico diana para permitir la hibridación en condiciones fisiológicas.

30 Como se usa en el presente documento, "complementariedad de nucleobase" o "complementariedad" cuando se refiere a nucleobases significa una nucleobase que es capaz de emparejarse con otra nucleobase. Por ejemplo, en el ADN, la adenina (A) es complementaria a la timina (T). Por ejemplo, en el ARN, la adenina (A) es complementaria al uracilo (U). En ciertas realizaciones, nucleobase complementaria significa una nucleobase de un compuesto antisentido que es capaz de emparejarse con una nucleobase de su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si una nucleobase en una determinada posición de un compuesto antisentido es capaz de unirse por hidrógeno con una nucleobase en una determinada posición de un ácido nucleico diana, entonces la posición de enlace de hidrógeno 35 entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera complementaria en ese par de nucleobases. Las nucleobases que comprenden ciertas modificaciones pueden mantener la capacidad de emparejarse con una nucleobase homóloga y, por lo tanto, todavía son capaces de complementariedad de nucleobase.

40 Como se usa en el presente documento, "no complementario" en referencia a las nucleobases significa un par de nucleobases que no forman enlaces de hidrógeno entre sí.

45 Como se usa en el presente documento, "complementario" en referencia a compuestos oligoméricos (p. ej., nucleósidos unidos, oligonucleótidos o ácidos nucleicos) significa la capacidad de dichos compuestos oligoméricos o regiones de los mismos para hibridarse con otro compuesto oligomérico o región de los mismos a través de la complementariedad de las bases nucleares en condiciones estrictas. Los compuestos oligoméricos complementarios no necesitan tener complementariedad de nucleobase en cada nucleósido. Por el contrario, se toleran algunos desajustes. En ciertas realizaciones, los compuestos o regiones oligoméricas complementarias son complementarias al 70% de las nucleobases (70% complementarias). En ciertas realizaciones, los compuestos o regiones oligoméricas 50 complementarias son 80% complementarias. En ciertas realizaciones, los compuestos o regiones oligoméricas complementarias son 90% complementarias. En ciertas realizaciones, los compuestos o regiones oligoméricas complementarias son 95% complementarios. En ciertas realizaciones, los compuestos o regiones oligoméricas complementarias son 100% complementarias.

55 Como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el emparejamiento de compuestos oligoméricos complementarios (p. ej., un compuesto antisentido y su ácido nucleico diana). Si bien no se limita a un mecanismo particular, el mecanismo más común de emparejamiento involucra enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre nucleobases complementarias.

60 Como se usa en el presente documento, "hibrida específicamente" significa la capacidad de un compuesto oligomérico de hibridarse con un sitio de ácido nucleico con mayor afinidad que la que hibrida con otro sitio de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido hibrida específicamente con más de un sitio diana.

65 Como se usa en el presente documento, "porcentaje de complementariedad" significa el porcentaje de nucleobases de un compuesto oligomérico que son complementarias a una porción de igual longitud de un ácido nucleico diana. Porcentaje de complementariedad se calcula dividiendo el número de nucleobases del compuesto oligomérico que

son complementarias a las nucleobases en las posiciones correspondientes en el ácido nucleico diana por la longitud total del compuesto oligomérico.

5 Como se usa en este documento, "porcentaje de identidad" significa el número de nucleobases en un primer ácido nucleico que son del mismo tipo (independientemente de la modificación química) que las nucleobases en las posiciones correspondientes en un segundo ácido nucleico, dividido por el número total de nucleobases en el primer ácido nucleico.

10 Como se usa en el presente documento, "modulación" significa un cambio de cantidad o calidad de una molécula, función o actividad cuando se compara con la cantidad o calidad de una molécula, función o actividad antes de la modulación. Por ejemplo, la modulación incluye el cambio, ya sea un aumento (estimulación o inducción) o una disminución (inhibición o reducción) en la expresión génica. Como otro ejemplo, la modulación de la expresión puede incluir un cambio en la selección del sitio de empalme del procesamiento previo al ARNm, lo que da como resultado un cambio en la cantidad absoluta o relativa de una variante de empalme particular en comparación con la cantidad en ausencia de modulación.

15 Como se usa en el presente documento, "motivo" significa un patrón de modificaciones químicas en un compuesto oligomérico o una región del mismo. Los motivos pueden definirse mediante modificaciones en ciertos nucleósidos y/o en ciertos grupos de enlace de un compuesto oligomérico.

20 Tal como se usa en el presente documento, "motivo de nucleósidos" significa un patrón de modificaciones de nucleósidos en un compuesto oligomérico o una región del mismo. Los enlaces de dicho compuesto oligomérico pueden modificarse o no modificarse. A menos que se indique lo contrario, los motivos que describen en este documento solo nucleósidos están destinados a ser motivos de nucleósidos. Por lo tanto, en tales casos, los enlaces no están limitados.

25 Como se usa en el presente documento, "motivo de azúcar" significa un patrón de modificaciones de azúcar en un compuesto oligomérico o una región del mismo.

30 Como se usa en el presente documento, "motivo de enlace" significa un patrón de modificaciones de enlace en un compuesto oligomérico o región del mismo. Los nucleósidos de dicho compuesto oligomérico pueden modificarse o no modificarse. A menos que se indique lo contrario, los motivos en el presente documento que describen solo enlaces están destinados a ser motivos de enlace. Por lo tanto, en tales casos, los nucleósidos no están limitados.

35 Como se usa en el presente documento, "motivo de modificación de nucleobase" significa un patrón de modificaciones a nucleobases a lo largo de un oligonucleótido. A menos que se indique lo contrario, un motivo de modificación de nucleobase es independiente de la secuencia de nucleobase.

40 Como se usa en el presente documento, "motivo de secuencia" significa un patrón de nucleobases dispuestas a lo largo de un oligonucleótido o una porción del mismo. A menos que se indique lo contrario, un motivo de secuencia es independiente de las modificaciones químicas y, por lo tanto, puede tener cualquier combinación de modificaciones químicas, incluidas las modificaciones químicas.

45 Como se usa en el presente documento, "tipo de modificación" en referencia a un nucleósido o un nucleósido de un "tipo" significa la modificación química de un nucleósido e incluye nucleósidos modificados y no modificados. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, un "nucleósido que tiene una modificación de un primer tipo" puede ser un nucleósido no modificado.

50 Como se usa en el presente documento, "modificado de manera diferente" significa modificaciones químicas o sustituyentes químicos que son diferentes entre sí, incluida la ausencia de modificaciones. Así, p. ej., un nucleósido MOE y un nucleósido de ADN no modificado están "modificados de manera diferente", aunque el nucleósido de ADN no esté modificado. Del mismo modo, el ADN y el ARN están "modificados de manera diferente", aunque ambos son nucleósidos no modificados de origen natural. Los nucleósidos que son iguales pero que comprenden nucleobases diferentes no se modifican de manera diferente. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un azúcar modificado 2'-OMe y una nucleobase de adenina no modificada y un nucleósido que comprende un azúcar modificado 2'-OMe y una nucleobase de timina no modificada no se modifican de manera diferente.

55 Como se usa en el presente documento, "el mismo tipo de modificaciones" se refiere a modificaciones que son iguales entre sí, incluida la ausencia de modificaciones. Así, p. ej., dos nucleósidos de ADN no modificados tienen "el mismo tipo de modificación", aunque el nucleósido de ADN no esté modificado. Dichos nucleósidos que tienen la misma modificación de tipo pueden comprender diferentes nucleobases.

60 Como se usa en el presente documento, "vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sustancia adecuada para su uso en la administración a un animal. En ciertas realizaciones, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable es solución salina estéril. En ciertas realizaciones, dicha solución salina estéril es solución salina de grado farmacéutico.

65

Como se usa en el presente documento, "sustituyente" y "grupo sustituyente" significa un átomo o grupo que reemplaza el átomo o grupo de un compuesto original nombrado. Por ejemplo, un sustituyente de un nucleósido modificado es cualquier átomo o grupo que difiere del átomo o grupo que se encuentra en un nucleósido natural (p. ej., un sustituyente 2' modificado es cualquier átomo o grupo en la posición 2' de un nucleósido otro que H o OH). Los grupos sustituyentes pueden estar protegidos o no protegidos. En ciertas realizaciones, los compuestos de la presente invención tienen sustituyentes en una o en más de una posición del compuesto original. Los sustituyentes también pueden estar sustituidos adicionalmente con otros grupos sustituyentes y pueden estar unidos directamente o mediante un grupo de enlace tal como un grupo alquilo o hidrocarbilo a un compuesto original.

Del mismo modo, como se usa en el presente documento, "sustituyente" en referencia a un grupo funcional químico significa que un átomo o grupo de átomos difiere del átomo o un grupo de átomos normalmente presente en el grupo funcional nombrado. En ciertas realizaciones, un sustituyente reemplaza un átomo de hidrógeno del grupo funcional (p. ej., en ciertas realizaciones, el sustituyente de un grupo metilo sustituido es un átomo o grupo distinto del hidrógeno que reemplaza uno de los átomos de hidrógeno de un grupo metilo no sustituido). A menos que se indique lo contrario, los grupos susceptibles de uso como sustituyentes incluyen, sin limitación, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquenilo, alquinilo, acilo (-C(O)R<sub>aa</sub>), carboxilo (-C(O)O-R<sub>aa</sub>), grupos alifáticos, grupos alicíclicos, alcoxi, oxi sustituido (-O-R<sub>aa</sub>), arilo, aralquilo, radical heterocíclico, heteroarilo, heteroarilalquilo, amino (-N(R<sub>bb</sub>)(R<sub>cc</sub>)), imino (=NR<sub>bb</sub>), amido (-C(O)N(R<sub>bb</sub>)(R<sub>cc</sub>) o -N(R<sub>bb</sub>)C(O)R<sub>aa</sub>), azido (-N<sub>3</sub>), nitro (-NO<sub>2</sub>), ciano (-CN), carbamido (-OC(O)N(R<sub>bb</sub>)(R<sub>cc</sub>) o -N(R<sub>bb</sub>)C(O)OR<sub>aa</sub>), ureido (-N(R<sub>bb</sub>)C(O)N(R<sub>bb</sub>)(R<sub>cc</sub>)), tioureido (-N(R<sub>bb</sub>)C(S)N(R<sub>bb</sub>)(R<sub>cc</sub>)), guanidinilo (-N(R<sub>bb</sub>)C(=NR<sub>bb</sub>)N(R<sub>bb</sub>)(R<sub>cc</sub>)), amidinilo (-C(=NR<sub>bb</sub>)N(R<sub>bb</sub>)(R<sub>cc</sub>) o -N(R<sub>bb</sub>)C(=NR<sub>bb</sub>)(R<sub>aa</sub>)), tiol (-SR<sub>bb</sub>), sulfmilo (-S(O)R<sub>bb</sub>), sulfonilo (-S(O)<sub>2</sub>R<sub>bb</sub>) y sulfonamidilo (-S(O)<sub>2</sub>N(R<sub>bb</sub>)(R<sub>cc</sub>) o -N(R<sub>bb</sub>)S(O)<sub>2</sub>R<sub>bb</sub>). Donde cada R<sub>aa</sub>, R<sub>bb</sub> y R<sub>cc</sub> es, independientemente, H, un grupo funcional químico opcionalmente unido o un grupo sustituyente adicional con una lista preferida que incluye, sin limitación, alquilo, alquenilo, alquinilo, alifático, alcoxi, acilo, arilo, aralquilo, heteroarilo, alicíclico, heterocíclico y heteroarilalquilo. Los sustituyentes seleccionados dentro de los compuestos descritos en el presente documento están presentes en un grado recursivo.

Como se usa en el presente documento, "alquilo", como se usa en el presente documento, significa un radical hidrocarbonado saturado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, sin limitación, metilo, etilo, propilo, butilo, isopropilo, n-hexilo, octilo, decilo, dodecilo y similares. Los grupos alquilo incluyen típicamente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono (C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo) con de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono siendo más preferido.

Como se usa en el presente documento, "alquenilo" significa un radical de cadena de hidrocarburo lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen, sin limitación, etenilo, propenilo, butenilo, 1-metilo-2-buten-1-ilo, dienos tales como 1,3-butadieno y similares. Los grupos alquenilo incluyen típicamente de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferidos de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquenilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

Como se usa en el presente documento, "alquinilo" significa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono y que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, sin limitación, etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo y similares. Los grupos alquinilo típicamente incluyen de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 2 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferidos de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono. Los grupos alquinilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente uno o más grupos sustituyentes adicionales.

Como se usa en el presente documento, "acilo" significa un radical formado por la eliminación de un grupo hidroxilo de un ácido orgánico y tiene la fórmula general -C(O)-X donde X es típicamente alifático, alicíclico o aromático. Los ejemplos incluyen carbonilos alifáticos, carbonilos aromáticos, sulfonilos alifáticos, sulfinilos aromáticos, sulfinilos alifáticos, fosfatos aromáticos, fosfatos alifáticos y similares. Los grupos acilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

Como se usa en el presente documento, "alicíclico" significa un sistema de anillo cíclico en donde el anillo es alifático. El sistema de anillos puede comprender uno o más anillos en los que al menos un anillo es alifático. Los alicíclicos preferidos incluyen anillos que tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 átomos de carbono en el anillo. Alicíclico, como se usa en el presente documento, puede incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

Como se usa en el presente documento, "alifático" significa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado que contiene hasta veinticuatro átomos de carbono en donde la saturación entre dos átomos de carbono es un enlace simple, doble o triple. Un grupo alifático contiene preferiblemente de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono, más típicamente de 1 a aproximadamente 12 átomos de carbono, siendo más preferidos de 1 a aproximadamente 6 átomos de carbono. La cadena lineal o ramificada de un grupo alifático puede interrumpirse con uno o más heteroátomos que incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo. Dichos grupos alifáticos interrumpidos por heteroátomos incluyen, sin limitación,

polialcoxis, tales como polialquilenglicoles, poliaminas y poliiminas. Los grupos alifáticos como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

5 Como se usa en el presente documento, "alcoxi" significa un radical formado entre un grupo alquilo y un átomo de oxígeno en donde el átomo de oxígeno se usa para unir el grupo alcoxi a una molécula original. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, sin limitación, metoxi, etoxi, propoxi, isopropoxi, n-butoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, n-pentoxi, neopentoxi, n-hexoxi y similares. Los grupos alcoxi como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

10 Como se usa en el presente documento, "aminoalquilo" significa un radical C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo sustituido con amino. La porción alquilo del radical forma un enlace covalente con una molécula original. El grupo amino se puede ubicar en cualquier posición y el grupo aminoalquilo se puede sustituir con un grupo sustituyente adicional en las porciones alquilo y/o amino.

15 Como se usa en el presente documento, "aralquilo" y "arilalquilo" significan un grupo aromático que está unido covalentemente a un radical C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo. La porción radical alquilo del grupo aralquilo (o arilalquilo) resultante forma un enlace covalente con una molécula parental. Los ejemplos incluyen, sin limitación, bencilo, fenetilo y similares. Los grupos aralquilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales unidos al alquilo, al arilo o a ambos grupos que forman el grupo radical.

20 Como se usa en el presente documento, "arilo" y "aromático" significan un radical de sistema de anillo carbocíclico mono o policíclico que tiene uno o más anillos aromáticos. Los ejemplos de grupos arilo incluyen, sin limitación, fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, idenilo y similares. Los sistemas de anillo de arilo preferidos tienen de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 átomos de carbono en uno o más anillos. Los grupos arilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

25 Como se usa en el presente documento, "halo" y "halógeno" significan un átomo seleccionado de flúor, cloro, bromo y yodo.

30 Como se usa en el presente documento, "heteroarilo" y "heteroaromático" significan un radical que comprende un anillo aromático mono o policíclico, un sistema de anillo o un sistema de anillo condensado en donde al menos uno de los anillos es aromático e incluye uno o más heteroátomos. Heteroarilo también está destinado a incluir sistemas de anillos fusionados que incluyen sistemas en los que uno o más de los anillos fusionados no contienen heteroátomos. Los grupos heteroarilo incluyen típicamente un átomo de anillo seleccionado de azufre, nitrógeno u oxígeno. Ejemplos de grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiadiazolilo, oxadiazolilo, tiofenilo, furanilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, quinoxalinilo y similares. Los radicales heteroarilo se pueden unir a una molécula original directamente o mediante un resto de enlace, como un grupo alifático o un heteroátomo. Los grupos heteroarilo como se usan en el presente documento pueden incluir opcionalmente grupos sustituyentes adicionales.

40

#### Compuestos oligoméricos

45 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos oligoméricos. En ciertas realizaciones, tales compuestos oligoméricos comprenden oligonucleótidos que opcionalmente comprenden uno o más grupos conjugados y/o terminales. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico consiste en un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una o más modificaciones químicas. Dichas modificaciones químicas incluyen modificaciones de uno o más nucleósidos (incluidas modificaciones en el resto de azúcar y/o la nucleobase) y/o modificaciones en uno o más enlaces internucleosídicos.

#### Ciertos restos de azúcar

50 En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la invención comprenden uno o más nucleósidos modificados que comprenden un resto de azúcar modificado. Dichos compuestos oligoméricos que comprenden uno o más nucleósidos modificados con azúcar pueden tener propiedades deseables, tales como mayor estabilidad de la nucleasa o mayor afinidad de unión con un ácido nucleico diana en relación con compuestos oligoméricos que comprenden solo nucleósidos que comprenden restos de azúcar naturales. En ciertas realizaciones, los restos de azúcar modificados son restos de azúcar sustituidos. En ciertas realizaciones, los restos de azúcar modificados son sustitutos de azúcar. Dichos sustitutos de azúcar pueden comprender una o más sustituciones correspondientes a las de restos de azúcar sustituidos.

55 En ciertas realizaciones, los restos de azúcar modificados son restos de azúcar sustituidos que comprenden uno o más sustituyentes, que incluyen pero no se limitan a sustituyentes en las posiciones 2' y/o 5'. Los ejemplos de sustituyentes de azúcar adecuados para la posición 2' incluyen, pero no se limitan a: 2'-F, 2'-OCH<sub>3</sub> ("OMe" u "O-metilo") y 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> ("MOE"). En ciertas realizaciones, los sustituyentes de azúcar en la posición 2' se seleccionan de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo sustituido; O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alcoxi; O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alcoxi sustituido,

60

OCF<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) y O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), donde cada R<sub>m</sub> y R<sub>n</sub> es, independientemente, H o C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo sustituido o no sustituido. Los ejemplos de sustituyentes de azúcar en la posición 5' incluyen, pero no se limitan a: 5'-metilo (R o S); 5'-vinilo y 5'-metoxi. En ciertas realizaciones, los azúcares sustituidos comprenden más de un sustituyente de azúcar no puente, p. ej., restos de azúcar metílico 2'-F-5' (véase, p. ej., Solicitud Internacional PCT WO 2008/101157, para 5', 2'-bis restos de azúcares sustituidos y nucleósidos adicionales).

Los nucleósidos que comprenden restos de azúcar sustituidos en 2' se denominan nucleósidos sustituidos en 2'. En ciertas realizaciones, un nucleósido sustituido en 2' comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de halo, alilo, amino, azido, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alcoxi; O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alcoxi sustituido, SH, CN, OCN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, O-alquilo, S-alquilo, N(R<sub>m</sub>)-alquilo; O-alqueno, S-alqueno, o N(R<sub>m</sub>)-alqueno; O-alquino, S-alquino, N(R<sub>m</sub>)-alquino; O-alqueno-O-alquilo, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo, O-aralquilo, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) o O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), donde cada R<sub>m</sub> y R<sub>n</sub> es, independientemente, H, un grupo protector de amino o C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo sustituido o no sustituido. Estos grupos sustituyentes en 2' pueden sustituirse adicionalmente con uno o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxilo, bencilo, fenilo, nitro (NO<sub>2</sub>), tiol, tioalcoxi (S-alquilo), halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.

En ciertas realizaciones, un 2'-nucleósido sustituido comprende un grupo de sustituyente 2' seleccionado de F, NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>; O-CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y acetamida N-sustituida (O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), donde cada R<sub>m</sub> y R<sub>n</sub> es, independientemente, H, un grupo protector de amino o C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquilo sustituido o no sustituido.

En ciertas realizaciones, un nucleósido sustituido en 2' comprende un resto de azúcar que comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, OCF<sub>3</sub>; O-CH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)CH<sub>3</sub>.

En ciertas realizaciones, un nucleósido sustituido en 2' comprende un resto de azúcar que comprende un grupo sustituyente en 2' seleccionado de F, O-CH<sub>3</sub>, y OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

Ciertos restos de azúcar modificados comprenden un sustituyente de azúcar puente que forma un segundo anillo que da como resultado un resto de azúcar bicíclico. En ciertas de tales realizaciones, el resto de azúcar bicíclico comprende un puente entre los átomos del anillo 4' y 2' furanosa. Los ejemplos de dichos sustituyentes de azúcar de 4' a 2' incluyen, entre otros: -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-, -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-O-, -C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-N(R)-O- o, -C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-O-N(R)-; 4'-CH<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (cEt) y 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2', y análogos de los mismos (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos 7,399,845, emitida el 15 de julio, 2008); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' y análogos de los mismos (véase, p. ej., WO2009/006478, publicada el 8 de enero de, 2009); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' y análogos de los mismos (véase, p. ej., WO2008/150729, publicado el 1 de diciembre de 2008); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (véase, p. ej., US2004/0171570, publicada el 2 de septiembre del 2004); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2' y 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', en donde cada R es, independientemente, H, un grupo protector, o C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo; 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', en donde R es H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo, o un grupo protector (véase, Patente de Estados Unidos 7,427,672, expedida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (véase, p. ej., Chattopadhyaya, et al, J. Org Chem, 2009, 74, 118-134); y 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' y análogos de los mismos (véase, publicada Solicitud Internacional PCT WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre, 2008).

En ciertas realizaciones, tales puentes de 4' a 2' comprenden independientemente de 1 a 4 grupos unidos seleccionados independientemente de -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-, -C(R<sub>a</sub>)=C(R<sub>b</sub>)-, -C(R<sub>a</sub>)=N-, -C(=NR<sub>a</sub>)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R<sub>a</sub>)<sub>2</sub>-, -S(=O)<sub>x</sub>-, y -N(R<sub>a</sub>)-; en donde:

x es 0, 1 o 2;

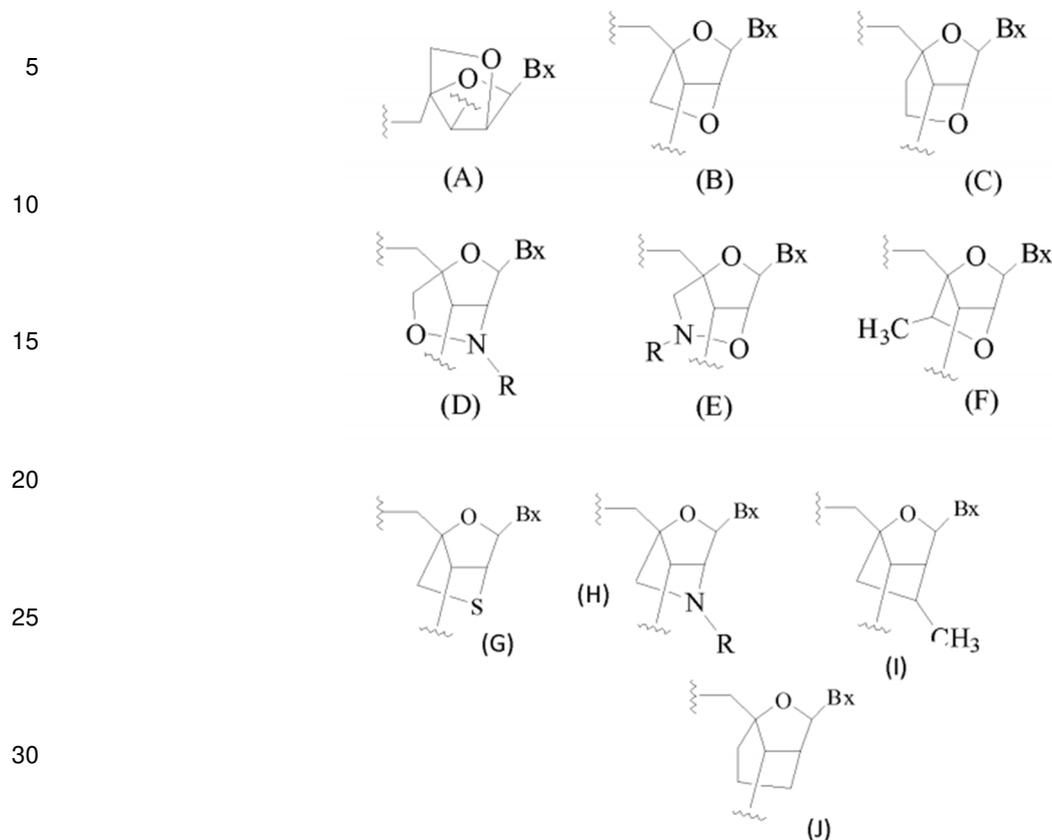
n es 1, 2, 3 o 4;

cada R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo sustituido, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alqueno, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alqueno sustituido, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alquino, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alquino sustituido, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> arilo, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> arilo sustituido, radical heterociclo, heterociclo radical sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> alicíclico, radical C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> alicíclico sustituido, halógeno, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, COOJ<sub>1</sub>, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(=O)<sub>2</sub>-J<sub>1</sub>) o sulfoxilo (S(=O)-J<sub>1</sub>); y

cada J<sub>1</sub> y J<sub>2</sub> es, independientemente, H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo sustituido, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alqueno, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alqueno sustituido, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alquino, C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> alquino sustituido, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> arilo, C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> arilo sustituido, (C(=O)-H) acilo, acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> aminoalquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> aminoalquilo sustituido, o un grupo protector.

Los nucleósidos que comprenden restos de azúcar bicíclicos se denominan nucleósidos bicíclicos o BNA. Los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, (A) α-L-Metileneoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, (B) β-D-Metileneoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA (también denominado ácido nucleico bloqueado o LNA), (C) Etileneoxi (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2') BNA, (D) Aminooxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2') BNA, (E) Oxiamino (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2') BNA, (F) Metilo (metileneoxi) (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') BNA (también denominado como acetato de constreñido o cEt), (G) metileno-tio (4'-CH<sub>2</sub>-S-2') BNA, (H) metilen-amino (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2') BNA, (I) metilo carbocíclico (4'-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-2') BNA y (J) propileno carbocíclico (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2') BNA

como representado a continuación.



35 en donde Bx es un resto nucleobase y R es, independientemente, H, un grupo protector, o C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> alquilo.

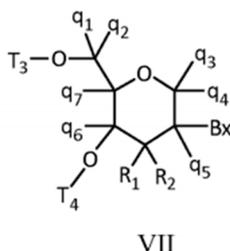
Se conocen en la técnica restos de azúcar bicíclico adicionales, por ejemplo: Singh et al., *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 2000, 97, 5633-5638; Kumar y col., *Bioorg. Med. Chem Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh y col., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava y col., *J. Am. Chem Soc.* 129 (26) 8362-8379 (4 de julio de 2007); Elayadi y col., *Curr. Opinión Invens. Drugs*, 2001, 2, 558-561; Braasch y col., *Chem. Biol.*, 2001, 8, 1-7; Orum y col., *Curr. Opinión Mol. Ther.*, 2001, 3, 239-243; Patentes de los EE.UU. N<sup>os</sup> 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 6,670,461 y 7,399,845; WO 2004/106356, WO 1994/14226, WO 2005/021570 y WO 2007/134181; Publicaciones de Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> US2004/0171570, US2007/0287831 y US2008/0039618; Patentes de Estados Unidos números de serie 12/129,154, 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787 y 61/099,844; y las solicitudes internacionales PCT N<sup>os</sup> PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154 y PCT/US2008/068922.

En ciertas realizaciones, los restos de azúcar bicíclicos y los nucleósidos que incorporan dichos restos de azúcar bicíclicos se definen adicionalmente por la configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2'-metileno-oxi, puede estar en la configuración  $\alpha$ -L o en la configuración  $\beta$ -D. Anteriormente, los nucleósidos bicíclicos  $\alpha$ -L-metileno-oxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') se han incorporado en oligonucleótidos antisentido que mostraron actividad antisentido (Frieden et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372).

En ciertas realizaciones, los restos de azúcar sustituidos comprenden uno o más sustituyentes de azúcar no puente y uno o más sustituyentes de azúcar puente (p. ej., azúcares puenteados 5'-sustituidos y 4'-2'), (ver, Solicitud Internacional PCT WO 2007/134181, publicada el 11/22/07, en donde LNA está sustituido con, p. ej., un grupo 5'-metilo o 5'-vinilo).

En ciertas realizaciones, los restos de azúcar modificados son sustitutos de azúcar. En ciertas realizaciones de este tipo, el átomo de oxígeno del azúcar natural se sustituye, p. ej., con un átomo de azufre, carbono o nitrógeno. En ciertas de tales realizaciones, dicho resto de azúcar modificado también comprende sustituyentes puenteantes y/o no puenteantes como se describió anteriormente. Por ejemplo, ciertos sustitutos de azúcar comprenden un átomo de azufre 4' y una sustitución en la posición 2' (véase, p. ej., la solicitud de patente de EE.UU. publicada US2005/0130923, publicada el 16 de junio de 2005) y/o la posición 5'. A modo de ejemplo adicional, se han descrito nucleósidos carbocíclicos bicíclicos que tienen un puente 4'-2' (ver, p. ej., Freier et al, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (22), 4429-4443 y Albaek et al., *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740).

En ciertas realizaciones, los sustitutos del azúcar comprenden anillos que tienen otros átomos que no son 5. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un sustituto de azúcar comprende un tetrahidropirano de seis miembros. Tales tetrahidropiranos pueden modificarse o sustituirse adicionalmente. Los nucleósidos que comprenden dichos tetrahidropiranos modificados incluyen, pero no se limitan a, ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) (*ver* Leumann, C.J. *Bioorg. y Med. Chem.* (2002) **10**:841-854), fluoro HNA (F-HNA) y aquellos compuestos que tienen Fórmula VII:



en donde independientemente para cada uno de dichos al menos un análogo de nucleósido de tetrahidropirano de Fórmula VII:

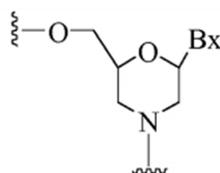
Bx es un resto nucleobase;

T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano al compuesto antisentido o uno de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> es un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo de nucleósido de tetrahidropirano al compuesto antisentido y el otro de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo terminal 5' o 3'; q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> y q<sub>7</sub> son cada uno, independientemente, H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo sustituido, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquenilo, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquenilo sustituido, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquinilo, o C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> alquinilo sustituido; y cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se selecciona independientemente entre: hidrógeno, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> y CN, en donde X es O, S o NJ<sub>1</sub>, y cada J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquilo.

En ciertas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos de THP modificados de Fórmula VII en donde q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> y q<sub>7</sub> son cada uno H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> y q<sub>7</sub> son distintos de H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> y q<sub>7</sub> es metilo. En ciertas realizaciones, se proporcionan nucleósidos de THP de Fórmula VII en donde uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es F. En ciertas realizaciones, R<sub>1</sub> es flúor y R<sub>2</sub> es H, R<sub>1</sub> es metoxi y R<sub>2</sub> es H, y R<sub>1</sub> es metoxietoxi y R<sub>2</sub> es H.

En la técnica se conocen muchos otros sistemas de anillos bicíclicos y tricíclicos de azúcar y sustitutos del azúcar que pueden usarse para modificar nucleósidos (véase, p. ej., el artículo de revisión: Leumann, J. C, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, 10, 841-854).

En ciertas realizaciones, los sustitutos del azúcar comprenden anillos que tienen más de 5 átomos y más de un heteroátomo. Por ejemplo, se han informado nucleósidos que comprenden restos de azúcar morfolino y su uso en compuestos oligoméricos (véase, por ejemplo: Braasch et al., *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510; y las patentes de los Estados Unidos 5,698,685; 5,166,315; 5,185,444; y 5,034,506). Como se usa aquí, el término "morfolino" significa una estructura azucarada:



En ciertas realizaciones, los morfolinos pueden modificarse, p. ej., añadiendo o alterando varios grupos sustituyentes de la estructura morfolino anterior. Tales sustitutos del azúcar se denominan en la presente memoria como "morfolinos modificados".

También se proporcionan combinaciones de modificaciones sin limitación, tales como nucleósidos sustituidos con 2'-F-5'-metilo (véase la solicitud internacional PCT WO 2008/101157 publicada el 8/21/08 para otros nucleósidos sustituidos 5', 2'-bis divulgados) y el reemplazo del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S y la sustitución adicional en la posición 2' (véase la solicitud de patente estadounidense publicada US2005-0130923, publicada el 16 de junio de 2005) o alternativamente la sustitución 5' de un ácido nucleico bicíclico (véase la solicitud internacional PCT WO 2007/134181, publicada el 11/22/07 en donde un nucleósido bicíclico 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' se sustituye adicionalmente en la posición 5' con un grupo de 5'-metilo o un 5'-vinilo). También se ha descrito la síntesis y preparación de

nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y estudios bioquímicos (véase, p. ej., Srivastava et al, J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (26), 8362-8379).

#### Ciertas nucleobases

5 En ciertas realizaciones, los nucleósidos de la presente invención comprenden una o más nucleobases no modificadas. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de la presente invención comprenden una o más nucleobases modificadas.

10 En ciertas realizaciones, las nucleobases modificadas se seleccionan de: bases universales, bases hidrófobas, bases promiscuas, bases expandidas por tamaño y bases fluoradas como se define en el presente documento. Pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo; 5-propinilcitosina; 5-hidroximetilo citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C≡C-CH<sub>3</sub>) uracilo y citosina y otros derivados alquilílicos de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina, 3-deazaguanina y 3-deazaadenina, bases universales, bases hidrofóbicas, bases promiscuas, bases de tamaño expandido y bases fluoradas como se define en el presente documento. Nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina ([5,4-b][1,4]benzoxazina-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazina-2(3H)-ona), abrazaderas G tales como una citidina de fenoxazina sustituida (p. ej. 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazina-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidina-2-ona).

25 Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Nucleobases adicionales incluyen las descritas en la Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 3,687,808, las descritas en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering*, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; las descritas por Englisch et al. *Angewandte Chemie*, Edición Internacional, 1991, 30, 613; y las descritas por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, Croke, S.T. y Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288.

30 Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de ciertas de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas incluyen, entre otros, los documentos US 3,687,808; 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,681,941; 5,750,692; 5,763,588; 5,830,653 y 6,005,096, algunos de los cuales son de propiedad común con la solicitud instantánea.

#### Ciertos enlaces internucleosídicos

40 La presente invención proporciona compuestos oligoméricos que comprenden nucleósidos unidos. En tales realizaciones, los nucleósidos pueden unirse entre sí usando cualquier enlace internucleosídico. Las dos clases principales de grupos de enlace internucleosídicos se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces internucleosídicos que contienen fósforo representativos incluyen, entre otros, fosfodiésteres (P=O), fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos (P=S). Los grupos de unión internucleosídicos representativos que no contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, metilen-metilimino (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-), tiodiester (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)<sub>2</sub>-O-); y N,N'-dimetilhidrazina (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-). Los enlaces modificados, en comparación con los enlaces fosfodiéster naturales, pueden usarse para alterar, típicamente aumentar, la resistencia a nucleasas del compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleosídicos que tienen un átomo quiral se pueden preparar como una mezcla racémica, o como enantiómeros separados. Los enlaces quirales representativos incluyen, pero sin limitación, alquifosfonatos y fosforotioatos. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de preparación de enlaces internucleosídicos que contienen fósforo y no fósforo.

55 Los oligonucleótidos descritos en este documento contienen uno o más centros asimétricos y dan lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras configuraciones estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S), α o β como para los anómeros de azúcar, o como (D) o (L) tal como para aminoácidos, etc. Incluidos en los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento están todos los isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras.

60 Enlaces de internucleosídicos neutros incluyen, sin limitación, fosfotriésteres, metilfosfonatos, MMI (3'-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-5'), amida-3 (3'-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)-5'), amida-4 (3'-CH<sub>2</sub>-N(H)-C(=O)-5'), formacetal (3'-O-CH<sub>2</sub>-O-5') y tioformacetal (3'-S-CH<sub>2</sub>-O-5'). Otros enlaces internucleosídicos neutros incluyen enlaces no iónicos que comprenden siloxano (dialquilsiloxano), éster carboxilato, carboxamida, sulfuro, éster sulfonato y amidas (ver, por ejemplo: *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y.S. Sanghvi y P.D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 y 4, 40-65). Otros enlaces de internucleosídicos neutros incluyen enlaces no iónicos que comprenden componentes N, O, S

y CH<sub>2</sub> mixtos.

#### Ciertos motivos

5 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos oligoméricos que comprenden oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, dichos oligonucleótidos comprenden una o más modificaciones químicas. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados químicamente comprenden uno o más nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados químicamente comprenden uno o más nucleósidos modificados que comprenden azúcares modificados. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos  
10 modificados químicamente comprenden uno o más nucleósidos modificados que comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados químicamente comprenden uno o más enlaces internucleosídicos modificados. En ciertas realizaciones, las modificaciones químicas (modificaciones de azúcar, modificaciones de nucleobase y/o modificaciones de enlace) definen un patrón o motivo. En ciertas realizaciones, los patrones de modificaciones químicas de restos de azúcar, enlaces internucleosídicos y nucleobases son  
15 independientes entre sí. Por lo tanto, un oligonucleótido puede describirse por su motivo de modificación de azúcar, motivo de enlace internucleosídico y/o motivo de modificación de nucleobase (como se usa en el presente documento, el motivo de modificación de nucleobase describe las modificaciones químicas de las nucleobases independientemente de la secuencia de nucleobases).

#### Ciertos motivos de azúcar

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden uno o más tipos de restos de azúcar modificados y/o restos de azúcar de origen natural dispuestos a lo largo de un oligonucleótido o región del mismo en un patrón definido o motivo de modificación de azúcar. Dichos motivos pueden incluir cualquiera de las modificaciones de azúcar discutidas  
25 aquí y/u otras modificaciones de azúcar conocidas.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden o consisten en una región que tiene un motivo de modificación de azúcar gápmero, que comprende dos regiones externas o "alas" y una región interna o "espacio". Las tres regiones de un motivo gápmero (el ala 5', el hueco y el ala 3') forman una secuencia contigua de nucleósidos en  
30 donde al menos algunos de los restos de azúcar de los nucleósidos de cada una de las alas difieren de al menos algunos de los restos de azúcar de los nucleósidos de la brecha. Específicamente, al menos los restos de azúcar de los nucleósidos de cada ala que están más cerca de la brecha (el nucleósido más 3' del ala 5' y el nucleósido más 5' del ala 3') difieren del resto de azúcar de los nucleósidos de la brecha vecina, definiendo así el límite entre las alas y la brecha. En ciertas realizaciones, los restos de azúcar dentro del espacio son iguales entre sí. En ciertas  
35 realizaciones, el espacio incluye uno o más nucleósidos que tienen un resto de azúcar que difiere del resto de azúcar de uno o más nucleósidos del espacio. En ciertas realizaciones, los motivos de modificación de azúcar de las dos alas son iguales entre sí (gápmero simétrico). En ciertas realizaciones, los motivos de modificación de azúcar del ala 5' difieren del motivo de modificación de azúcar del ala 3' (gápmero asimétrico). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden nucleósidos modificados con 2'-MOE en las alas y nucleósidos modificados con 2'-F en  
40 el espacio.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos están completamente modificados. En ciertas de tales realizaciones, los oligonucleótidos se modifican uniformemente. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son 2'-MOE uniformes. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son uniformes 2'-F. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son morfolino uniforme. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son BNA uniformes. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son LNA uniformes. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son cEt uniformes.  
45

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una región modificada uniformemente y nucleósidos adicionales que no se modifican o se modifican de manera diferente. En ciertas realizaciones, la región uniformemente modificada tiene al menos 5, 10, 15 o 20 nucleósidos de longitud. En ciertas realizaciones, la región uniforme es una región 2'-MOE. En ciertas realizaciones, la región uniforme es una región 2'-F. En ciertas realizaciones, la región uniforme es una región de morfolino. En ciertas realizaciones, la región uniforme es una región BNA. En ciertas realizaciones, la región uniforme es una región LNA. En ciertas realizaciones, la región uniforme es una región cEt.  
50

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido no comprende más de 4 2'-desoxinucleósidos contiguos sin modificar. En determinadas circunstancias, los oligonucleótidos antisentido que comprenden más de 4 2'-desoxinucleósidos contiguos activan la RNasa H, lo que da como resultado la escisión del ARN diana. En ciertas realizaciones, dicha escisión se evita al no tener más de 4 2'-desoxinucleósidos contiguos, p. ej., donde se desea la alteración del empalme y no la escisión de un ARN diana.  
55

#### Ciertos motivos de enlace de internucleósidos

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden enlaces internucleosídicos modificados dispuestos a lo largo del oligonucleótido o región del mismo en un patrón definido o motivo de enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, los enlaces de internucleosídicos están dispuestos en un motivo vacío, como se describió anteriormente para el motivo de modificación de azúcar. En tales realizaciones, los enlaces internucleosídicos en cada una de las dos  
65

regiones del ala son diferentes de los enlaces internucleósidos en la región de separación. En ciertas realizaciones, los enlaces internucleósidos en las alas son fosfodiéster y los enlaces internucleósidos en el espacio son fosforotioato. El motivo de modificación del azúcar se selecciona independientemente, de modo que tales oligonucleótidos que tienen un motivo de enlace de internucleósidos con espacio pueden o no tener un motivo de modificación de azúcar con espacio y si tiene un motivo de azúcar con espacio, las longitudes de ala y espacio pueden ser o no iguales.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden una región que tiene un motivo de enlace de internucleósidos alternativo. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos de la presente invención comprenden una región de enlaces internucleósidos modificados uniformemente. En ciertas realizaciones de este tipo, el oligonucleótido comprende una región que está unida uniformemente por enlaces internucleósidos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido está unido de manera uniforme por fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleósido del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace de internucleósidos del oligonucleótido se selecciona de fosfodiéster y fosforotioato y al menos un enlace de internucleósidos es fosforotioato.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 6 enlaces internucleósidos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 8 enlaces internucleósidos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos 10 enlaces internucleósidos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 6 enlaces de internucleósidos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 8 enlaces de internucleósidos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 10 enlaces consecutivos de fosforotioato internucleósido. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido comprende al menos un bloque de al menos 12 enlaces internucleósidos de fosforotioato consecutivos. En ciertas realizaciones de este tipo, al menos uno de dichos bloques está ubicado en el extremo 3' del oligonucleótido. En ciertas realizaciones de este tipo, al menos uno de tales bloques está ubicado dentro de 3 nucleósidos del extremo 3' del oligonucleótido.

#### Ciertos motivos de modificación de nucleobase

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden modificaciones químicas a nucleobases dispuestas a lo largo del oligonucleótido o región del mismo en un patrón definido o motivo de modificación de nucleobases. En ciertas realizaciones de este tipo, las modificaciones de nucleobase están dispuestas en un motivo vacío. En ciertas realizaciones, las modificaciones de nucleobase están dispuestas en un motivo alternativo. En ciertas realizaciones, cada nucleobase se modifica. En ciertas realizaciones, ninguna de las nucleobases se modifica químicamente.

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden un bloque de nucleobases modificadas. En ciertas de tales realizaciones, el bloque está en el extremo 3' del oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el bloque está dentro de 3 nucleótidos del extremo 3' del oligonucleótido. En ciertas de tales realizaciones, el bloque está en el extremo 5' del oligonucleótido. En ciertas realizaciones, el bloque está dentro de 3 nucleótidos del extremo 5' del oligonucleótido.

En ciertas realizaciones, las modificaciones de nucleobase son una función de la base natural en una posición particular de un oligonucleótido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, cada purina o cada pirimidina se modifica en un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, se modifica cada adenina. En ciertas realizaciones, se modifica cada guanina. En ciertas realizaciones, se modifica cada timina. En ciertas realizaciones, se modifica cada citosina. En ciertas realizaciones, se modifica cada uracilo.

En ciertas realizaciones, algunos, todos o ninguno de los restos de citosina en un oligonucleótido son restos de 5-metilo citosina. Aquí, 5-metilo citosina no es una "nucleobase modificada". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, las nucleobases no modificadas incluyen tanto residuos de citosina que tienen un 5-metilo como aquellos que carecen de un 5 metilo. En ciertas realizaciones, se especifica el estado de metilación de todas o algunas nucleobases de citosina.

#### Ciertas longitudes totales

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos oligoméricos que incluyen oligonucleótidos de cualquiera de una variedad de rangos de longitudes. En ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos u oligonucleótidos que consisten en nucleósidos unidos de X a Y, donde X representa el menor número de nucleósidos en el intervalo e Y representa el mayor número de nucleósidos en el rango. En ciertas realizaciones de este tipo, X e Y se seleccionan cada uno independientemente de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50; siempre que  $X \leq Y$ . Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la invención proporciona compuestos oligoméricos que comprenden oligonucleótidos que consisten en 8 a 9, 8 a 10, 8 a 11, 8 a 12, 8 a 13, 8 a 14, 8 a 15, 8 a 16, 8 a 17, 8 a 18, 8 a 19, 8 a 20, 8 a 21, 8 a 22, 8 a 23, 8 a 24, 8 a 25, 8 a 26, 8 a 27, 8 a 28, 8 a 29, 8 a 30, 9 a 10, 9 a 11, 9 a 12, 9 a 13, 9 a 14, 9 a 15, 9 a 16, 9 a 17, 9 a 18, 9 a 19, 9 a 20, 9 a 21, 9 a 22, 9 a 23, 9 a 24, 9 a 25, 9 a 26, 9 a 27, 9 a 28, 9 a 29, 9 a 30, 10 a 11, 10 a 12, 10 a 13, 10 a 14, 10 a 15, 10 a 16, 10 a 17, 10 a 18, 10 a 19, 10 a 20, 10 a 21, 10 a 22, 10 a 23, 10 a 24, 10 a 25, 10 a 26, 10 a 27, 10 a 28, 10 a 29, 10 a 30, 11 a 12, 11 a 13, 11 a 14, 11 a 15, 11 a 16, 11 a 17, 11

a 18, 11 a 19, 11 a 20, 11 a 21, 11 a 22, 11 a 23, 11 a 24, 11 a 25, 11 a 26, 11 a 27, 11 a 28, 11 a 29, 11 a 30, 12 a 13, 12 a 14, 12 a 15, 12 a 16, 12 a 17, 12 a 18, 12 a 19, 12 a 20, 12 a 21, 12 a 22, 12 a 23, 12 a 24, 12 a 25, 12 a 26, 12 a 27, 12 a 28, 12 a 29, 12 a 30, 13 a 14, 13 a 15, 13 a 16, 13 a 17, 13 a 18, 13 a 19, 13 a 20, 13 a 21, 13 a 22, 13 a 23, 13 a 24, 13 a 25, 13 a 26, 13 a 27, 13 a 28, 13 a 29, 13 a 30, 14 a 15, 14 a 16, 14 a 17, 14 a 18, 14 a 19, 14 a 20, 14 a 21, 14 a 22, 14 a 23, 14 a 24, 14 a 25, 14 a 26, 14 a 27, 14 a 28, 14 a 29, 14 a 30, 15 a 16, 15 a 17, 15 a 18, 15 a 19, 15 a 20, 15 a 21, 15 a 22, 15 a 23, 15 a 24, 15 a 25, 15 a 26, 15 a 27, 15 a 28, 15 a 29, 15 a 30, 16 a 17, 16 a 18, 16 a 19, 16 a 20, 16 a 21, 16 a 22, 16 a 23, 16 a 24, 16 a 25, 16 a 26, 16 a 27, 16 a 28, 16 a 29, 16 a 30, 17 a 18, 17 a 19, 17 a 20, 17 a 21, 17 a 22, 17 a 23, 17 a 24, 17 a 25, 17 a 26, 17 a 27, 17 a 28, 17 a 29, 17 a 30, 18 a 19, 18 a 20, 18 a 21, 18 a 22, 18 a 23, 18 a 24, 18 a 25, 18 a 26, 18 a 27, 18 a 28, 18 a 29, 18 a 30, 19 a 20, 19 a 21, 19 a 22, 19 a 23, 19 a 24, 19 a 25, 19 a 26, 19 a 27, 19 a 28, 19 a 29, 19 a 30, 20 a 21, 20 a 22, 20 a 23, 20 a 24, 20 a 25, 20 a 26, 20 a 27, 20 a 28, 20 a 29, 20 a 30, 21 a 22, 21 a 23, 21 a 24, 21 a 25, 21 a 26, 21 a 27, 21 a 28, 21 a 29, 21 a 30, 22 a 23, 22 a 24, 22 a 25, 22 a 26, 22 a 27, 22 a 28, 22 a 29, 22 a 30, 23 a 24, 23 a 25, 23 a 26, 23 a 27, 23 a 28, 23 a 29, 23 a 30, 24 a 25, 24 a 26, 24 a 27, 24 a 28, 24 a 29, 24 a 30, 25 a 26, 25 a 27, 25 a 28, 25 a 29, 25 a 30, 26 a 27, 26 a 28, 26 a 29, 26 a 30, 27 a 28, 27 a 29, 27 a 30, 28 a 29, 28 a 30 o 29 a 30 nucleósidos unidos. En realizaciones en las que el número de nucleósidos de un compuesto oligomérico u oligonucleótido está limitado, ya sea a un intervalo o a un número específico, el compuesto oligomérico u oligonucleótido puede, sin embargo, comprender además otros sustituyentes adicionales. Por ejemplo, un oligonucleótido que comprende 8-30 nucleósidos excluye los oligonucleótidos que tienen 31 nucleósidos, pero, a menos que se indique lo contrario, dicho oligonucleótido puede comprender además, p. ej., uno o más conjugados, grupos terminales u otros sustituyentes. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido gápmero tiene cualquiera de las longitudes anteriores.

Un experto en la materia apreciará que ciertas longitudes pueden no ser posibles para ciertos motivos. Por ejemplo: un gápmero que tiene una región de ala 5' que consta de cuatro nucleótidos, un espacio que consiste de al menos seis nucleótidos y una región de ala 3' que consta de tres nucleótidos no puede tener una longitud total inferior a 13 nucleótidos. Por lo tanto, se entendería que el límite de longitud inferior es 13 y que el límite de 10 en "10-20" no tiene ningún efecto en esa realización.

Además, cuando un oligonucleótido se describe por un rango de longitud total y por regiones que tienen longitudes especificadas, y donde la suma de las longitudes especificadas de las regiones es menor que el límite superior del rango de longitud total, el oligonucleótido puede tener nucleósidos adicionales, más allá de esos de las regiones especificadas, siempre que el número total de nucleósidos no exceda el límite superior del rango de longitud total. Por ejemplo, un oligonucleótido que consiste en 20-25 nucleósidos unidos que comprende un ala 5' que consiste en 5 nucleósidos unidos; un ala 3' que consta de 5 nucleósidos unidos y un espacio central que consta de 10 nucleósidos unidos ( $5 + 5 + 10 = 20$ ) puede tener hasta 5 nucleósidos que no son parte del ala 5', el ala 3', o la brecha (antes de alcanzar la limitación de longitud total de 25). Dichos nucleósidos adicionales pueden ser 5' del ala 5' y/o 3' del ala 3'.

#### Ciertos oligonucleótidos

En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos de la presente invención se caracterizan por su motivo de azúcar, motivo de enlace internucleosídico, motivo de modificación de nucleobase y longitud total. En ciertas realizaciones, tales parámetros son independientes entre sí. Por lo tanto, cada enlace internucleosídico de un oligonucleótido que tiene un motivo de azúcar gápmero puede modificarse o no modificarse y puede seguir o no el patrón de modificación gápmero de las modificaciones de azúcar. Por lo tanto, los enlaces internucleosídicos dentro de las regiones del ala de un gápmero de azúcar pueden ser iguales o diferentes entre sí y pueden ser iguales o diferentes de los enlaces internucleosídicos de la región hueco. Del mismo modo, dichos oligonucleótidos de gápmero de azúcar pueden comprender una o más nucleobases modificadas independientemente del patrón de gápmero de las modificaciones de azúcar. Aquí, si una descripción de un oligonucleótido o compuesto oligomérico es silenciosa con respecto a uno o más parámetros, dicho parámetro no está limitado. Por lo tanto, un compuesto oligomérico descrito solo como que tiene un motivo de azúcar gápmero sin una descripción adicional puede tener cualquier longitud, motivo de enlace internucleosídico y motivo de modificación de nucleobase. A menos que se indique lo contrario, todas las modificaciones químicas son independientes de la secuencia de nucleobase.

#### Ciertos grupos conjugados

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos se modifican mediante la unión de uno o más grupos conjugados. En general, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del compuesto oligomérico unido, que incluyen, pero no se limitan a, farmacodinámica, farmacocinética, estabilidad, unión, absorción, distribución celular, absorción celular, carga y aclaramiento. Los grupos conjugados se usan rutinariamente en las técnicas químicas y se unen directamente o mediante un resto de unión conjugado opcional o un grupo de unión conjugado a un compuesto original tal como un compuesto oligomérico, tal como un oligonucleótido. Los grupos conjugados incluyen, entre otros, intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesteroles, tiocolesteroles, restos de ácido cólico, ácido fólico, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acuamantano, acuamantano, acuamantano, acuamantano, acuamantano Rodaminas, cumarinas y colorantes. Ciertos grupos conjugados se han descrito previamente, por ejemplo: resto de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, p. ej., hexilo-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. NY Acad. Sci., 1992,

660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolésterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, p. ej., do-decan-diol o residuos 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, p. ej., di-hexadecilo-rac-glicerol o trietilo-amonio 1,2-di-O-hexadecilo-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una cadena de poliamina o polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys Acta, 1995, 1264, 229-237), o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonilo-oxicocolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

En ciertas realizaciones, un grupo conjugado comprende una sustancia farmacológica activa, p. ej., aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fen-bufen, ketoprofeno, (s)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triiodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indo-meticina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

En ciertas realizaciones, los grupos conjugados están unidos directamente a oligonucleótidos en compuestos oligoméricos. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados están unidos a oligonucleótidos mediante un grupo de unión conjugado. En ciertas de tales realizaciones, los grupos de unión conjugados, que incluyen, pero no se limitan a, restos de unión bifuncionales tales como los conocidos en la técnica son susceptibles a los compuestos proporcionados aquí. Los grupos de enlace conjugados son útiles para la unión de grupos conjugados, tales como grupos estabilizadores químicos, grupos funcionales, grupos informadores y otros grupos a sitios selectivos en un compuesto original tal como, p. ej., un compuesto oligomérico. En general, un resto de unión bifuncional comprende un resto hidrocarbilo que tiene dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales se selecciona para unirse a una molécula madre o compuesto de interés y el otro se selecciona para unirse esencialmente a cualquier grupo seleccionado, como un grupo funcional químico o un grupo conjugado. En algunas realizaciones, el conector conjugado comprende una estructura de cadena o un oligómero de unidades repetitivas tales como unidades de etilenglicol o aminoácidos. Los ejemplos de grupos funcionales que se usan rutinariamente en un resto de enlace bifuncional incluyen, entre otros, electrófilos para reaccionar con grupos nucleófilos y nucleófilos para reaccionar con grupos electrófilos. En algunas realizaciones, los restos de unión bifuncionales incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, insaturaciones (p. ej., enlaces dobles o triples) y similares.

Algunos ejemplos no limitantes de restos de unión conjugada incluyen pirrolidina, 8-amino-3,6-ácido dioxaoctanoico (ADO), succinimidilo 4-(N-maleimidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) y ácido 6-aminohexanoico (AHX o AHA). Otros grupos de unión incluyen, pero no se limitan a, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquilo sustituido, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alqueno sustituido o no sustituido o C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> alquino sustituido o no sustituido, en donde una lista no limitante de grupos sustituyentes preferidos incluye hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino.

Los grupos conjugados pueden estar unidos a uno o ambos extremos de un oligonucleótido (grupos conjugados terminales) y/o en cualquier posición interna.

En ciertas realizaciones, los grupos conjugados están en el extremo 3' de un oligonucleótido de un compuesto oligomérico. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados están cerca del extremo 3'. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados están unidos en el extremo 3' de un compuesto oligomérico, pero antes de uno o más nucleósidos del grupo terminal. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados se colocan dentro de un grupo terminal.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos oligoméricos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, un compuesto oligomérico comprende un oligonucleótido y uno o más grupos conjugados y/o terminales. Dichos grupos conjugados y/o terminales pueden agregarse a oligonucleótidos que tengan cualquiera de los motivos químicos discutidos anteriormente. Así, p. ej., un compuesto oligomérico que comprende un oligonucleótido que tiene una región de nucleósidos alternos puede comprender un grupo terminal.

#### Compuestos antisentido

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos de la presente invención son compuestos antisentido. Dichos compuestos antisentido son capaces de hibridarse con un ácido nucleico diana, dando como resultado al menos una actividad antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido hibridan específicamente con uno o más ácidos nucleicos diana. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido que hibrida específicamente tiene una secuencia de nucleobase que comprende una región que tiene suficiente complementariedad con un ácido nucleico diana para permitir hibridación y dar como resultado una actividad antisentido y una complementariedad insuficiente con cualquier no objetivo para evitar la hibridación no específica con cualquier secuencia de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea la hibridación específica (p. ej., en condiciones fisiológicas para usos in vivo o terapéuticos, y en condiciones en las que se realizan ensayos en el caso de ensayos in vitro).

Los oligonucleótidos para uso en la invención son al menos 90% complementarios al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a compuestos antisentido que comprenden oligonucleótidos que son

completamente complementarios al ácido nucleico diana en toda la longitud del oligonucleótido. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son 99% complementarios al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos son 95% complementarios al ácido nucleico diana.

5 En ciertas realizaciones, dichos oligonucleótidos son 85% complementarios al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, dichos oligonucleótidos son 80% complementarios al ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido comprende una región que es completamente complementaria a un ácido nucleico diana y es al menos 80% complementaria al ácido nucleico diana en toda la longitud del oligonucleótido. En ciertas realizaciones de este tipo, la región de completa complementariedad tiene una longitud de 6 a 14 nucleobases.

10 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido y los oligonucleótidos antisentido comprenden compuestos monocatenarios. En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido y los oligonucleótidos antisentido comprenden compuestos de doble cadena.

15 Ciertas vías y mecanismos asociados con las lipofuscinosis ceroides neuronales

Las lipofuscinosis neuronales ceroides (NCL) es el nombre general de una familia de trastornos neurodegenerativos que resultan de la acumulación excesiva de lipopigmentos, p. ej., lipofuscina, en los tejidos del cuerpo. La lipofuscinosis ceroide neuronal juvenil (JNCL), también conocida como enfermedad de Batten, es el más común de los trastornos de NCL. En ciertas realizaciones, el inicio de JNCL ocurre entre los cinco y ocho años de edad y los síntomas incluyen pérdida progresiva de la función motora, convulsiones, pérdida de la visión y pérdida de la función cognitiva, lo que resulta en la muerte antes de los 30 años.

20 JNCL es un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones del gen CLN3. Aproximadamente el 80% de los casos de JNCL son el resultado de una eliminación particular del gen CLN3 que abarca los exones 7 y 8 (*CLN3Δ78*). En ciertas realizaciones, la delección de *CLN3Δ78* provoca un desplazamiento del marco que da como resultado un codón de parada prematuro en el exón 9. En ciertas realizaciones, el producto proteico truncado de *CLN3Δ78* es el 33% de la longitud de la proteína CLN3 de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el producto proteico truncado de *CLN3Δ78* no es funcional. En ciertas realizaciones, el producto proteico truncado de *CLN3Δ78* es parcialmente funcional.

25 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido complementarios al transcrito mutante *CLN3Δ78* eliminan el desplazamiento de trama que da como resultado un codón de parada prematuro en el exón 9. En ciertas realizaciones, p. ej., los oligonucleótidos antisentido complementarios al transcrito mutante *CLN3Δ78* producen ARNm *CLN3Δ78* que tiene exones corrientes abajo del exón 9. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido complementarios al transcrito mutante *CLN3Δ78* producen ARNm de *CLN3Δ78* que tiene exones 10 y/u 11. En ciertas realizaciones, p. ej., los oligonucleótidos antisentido complementarios al transcrito mutante *CLN3Δ78* producen un borrado parcialmente, pero sigue siendo funcional la proteína *CLN3Δ78*.

30 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido complementarios al exón 6 de una transcripción de *CLN3Δ78* inducen la omisión del exón 6 y eliminan el desplazamiento del marco en el pre-ARNm de *CLN3Δ78* que da como resultado un codón de parada prematuro en el exón 9. En tales realizaciones, los oligonucleótidos complementarios al exón 6 de una transcripción de *CLN3Δ78* producen ARNm de *CLN3Δ78* sin el exón 6, pero con los exones restantes (p. ej., exones 1, 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11). En ciertas realizaciones, el ARNm de *CLN3Δ78* que tiene los exones restantes se traduce en una proteína *CLN3Δ78* que es parcialmente funcional. En ciertas realizaciones, el ARNm de *CLN3Δ78* que tiene los exones restantes se traduce en una proteína *CLN3Δ78* que funciona de manera similar a la proteína CLN3 de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el ARNm de *CLN3Δ78* que tiene los exones restantes se traduce en una proteína *CLN3Δ78* que funciona mejor que el producto proteico truncado de *CLN3Δ78* que contiene el codón de parada prematuro. En ciertas realizaciones, el ARNm de *CLN3Δ78* que tiene los exones restantes se traduce en una proteína *CLN3Δ78* que no produce la acumulación excesiva de lipopigmentos en el tejido corporal.

35 En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido complementarios al exón 9 de una transcripción de *CLN3Δ78* inducen la omisión del exón 9 y eliminan el desplazamiento del marco en el pre-ARNm de *CLN3Δ78* que da como resultado un codón de parada prematuro en el exón 9. En tales realizaciones, los oligonucleótidos complementarios al exón 9 de una transcripción de *CLN3Δ78* producen ARNm de *CLN3Δ78* sin el exón 9, pero con los exones restantes (p. ej., exones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11...). En ciertas realizaciones, el ARNm de *CLN3Δ78* que tiene los exones restantes, p. ej., los exones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11..., se traduce en una proteína *CLN3Δ78* que es parcialmente funcional. En ciertas realizaciones, el ARNm de *CLN3Δ78* que falta en los exones 7, 8 y 9 se traduce en una proteína *CLN3Δ78* que funciona de manera similar a la proteína CLN3 de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el ARNm de *CLN3Δ78* que falta en los exones 7, 8 y 9 se traduce en una proteína *CLN3Δ78* que funciona mejor que el producto proteico truncado de *CLN3Δ78* que contiene el codón de parada prematuro. En ciertas realizaciones, el ARNm de *CLN3Δ78* que falta en los exones 7, 8 y 9 se traduce en una proteína *CLN3Δ78* que no produce la acumulación excesiva de lipopigmentos en el tejido corporal.

65 Ciertos ácidos nucleicos diana y mecanismos

- 5 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido comprenden o consisten en un oligonucleótido que comprende una región que es complementaria a un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico diana es una molécula de ARN endógeno. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico diana es un pre-ARNm. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico diana es un transcrito de CLN3. En ciertas realizaciones, el ARN diana es un pre-ARNm de CLN3.
- 10 En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido es complementario a una región de pre-ARNm de CLN3. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido es complementario a una región de pre-ARNm de CLN3 que comprende una unión de empalme intrón-exón. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido es complementario a una región de pre-ARNm de CLN3 que comprende la unión de empalme intrón-exón adyacente al exón 6. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido es complementario dentro de una región de pre-ARNm de CLN3 que consiste en el exón 6. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido es complementario dentro de una región de pre-ARNm de CLN3 que comprende un silenciador de empalme exónico dentro de un exón 6. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido es complementario a una región de pre-ARNm de CLN3 que comprende la unión de empalme intrón-exón adyacente al exón 9. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido es complementario dentro de una región de pre-ARNm de CLN3 que consiste en el exón 9. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido es complementario dentro de una región de pre-ARNm de CLN3 que comprende un silenciador de empalme exónico dentro de un exón 9.
- 20 En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consta de 8 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobase que comprende una región complementaria que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una región diana de igual longitud de un transcrito CLN3. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5082 y la nucleobase 5119 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5082 y la nucleobase 5099 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5053 y la nucleobase 5070 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5086 y la nucleobase 5103 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5090 y nucleobase 5107 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5094 y nucleobase 5111 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5098 y nucleobase 5115 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5102 y la nucleobase 5119 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5126 y la nucleobase 5143 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana es w en la nucleobase 5134 y la nucleobase 5155 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5134 y la nucleobase 5151 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 5138 y la nucleobase 5155 de SEQ ID NO.: 2.
- 35 En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consta de 8 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobase que comprende una región complementaria que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una región diana de igual longitud de un transcrito CLN3. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 7366 y la nucleobase 7411 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 7366 y la nucleobase 7383 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 7370 y la nucleobase 7387 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 7371 y la nucleobase 7388 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 7387 y nucleobase 7404 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 7394 y nucleobase 7411 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 7454 y nucleobase 7471 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 7462 y la nucleobase 7483 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana está dentro de la nucleobase 7462 y nucleobase 7479 de SEQ ID NO.: 2. En ciertas realizaciones, la región diana es w en la nucleobase 7466 y la nucleobase 7483 de SEQ ID NO.: 2.
- 50 En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 3. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 4. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 5. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 6. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 7. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 8. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 9. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 10. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 11. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 12. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 13. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 14. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 15. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende la SEQ ID NO. 16. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que comprende SEQ ID NO. 17.
- 65







ID NO. 113. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 114. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 115. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 116. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 117. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 118. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 119. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 120. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 121. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en la SEQ ID NO. 122. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 123. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 124. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 125. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 126. En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobase que consiste en SEQ ID NO. 127.

#### Ciertas composiciones farmacéuticas

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, dicha composición farmacéutica comprende un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende una solución salina estéril y uno o más compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, dicha composición farmacéutica consiste en una solución salina estéril y uno o más compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, la solución salina estéril es solución salina de grado farmacéutico. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende uno o más compuestos antisentido y agua estéril. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica consiste en uno o más compuestos antisentido y agua estéril. En ciertas realizaciones, la solución salina estéril es agua de grado farmacéutico. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende uno o más compuestos antisentido y solución salina tamponada con fosfato (PBS). En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica consiste en uno o más compuestos antisentido y solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS). En ciertas realizaciones, la solución salina estéril es PBS de grado farmacéutico.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido pueden mezclarse con sustancias activas y/o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de varios criterios, que incluyen, entre otros, la vía de administración, el alcance de la enfermedad o la dosis a administrar.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido abarcan cualquier sal, éster o sal farmacéuticamente aceptable de tales ésteres. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido comprenden uno o más oligonucleótidos que, tras la administración a un animal, incluido un humano, sean capaces de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo del mismo. Por consiguiente, p. ej., la divulgación también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio y potasio.

Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto oligomérico que se escinden por nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto oligomérico antisentido activo.

Los restos lipídicos se han usado en terapias de ácido nucleico en una variedad de métodos. En ciertos métodos de este tipo, el ácido nucleico se introduce en liposomas o lipoplejos preformados hechos de mezclas de lípidos catiónicos y lípidos neutros. En ciertos métodos, los complejos de ADN con lípidos mono o policationicos se forman sin la presencia de un lípido neutro. En ciertas realizaciones, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico a una célula o tejido particular. En ciertas realizaciones, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico al tejido graso. En ciertas realizaciones, se selecciona un resto lipídico para aumentar la distribución de un agente farmacéutico al tejido muscular.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenden uno o más oligonucleótidos modificados y uno o más excipientes. En ciertas realizaciones, los excipientes se seleccionan de agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en este documento comprende un sistema de administración. Los ejemplos de sistemas de administración incluyen, entre otros, liposomas y emulsiones. Ciertos sistemas de administración son útiles para preparar ciertas composiciones farmacéuticas que incluyen aquellas que comprenden compuestos hidrofóbicos. En ciertas realizaciones, se usan ciertos disolventes orgánicos tales como

dimetilsulfóxido.

5 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en el presente documento comprende una o más moléculas de administración específicas de tejido diseñadas para administrar el uno o más agentes farmacéuticos de la presente invención a tejidos o tipos de células específicos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen liposomas recubiertos con un anticuerpo específico de tejido.

10 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en este documento comprende un sistema codisolvente. Ciertos de dichos sistemas codisolventes comprenden, p. ej., alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. En ciertas realizaciones, tales sistemas de codisolventes se usan para compuestos hidrófobos. Un ejemplo no limitativo de dicho sistema codisolvente es el sistema codisolvente VPD, que es una solución de etanol absoluto que comprende 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del tensioactivo no polar Polysorbate 80™ y 65% p/v de polietilenglicol 300. Las proporciones de dichos sistemas codisolventes pueden variar considerablemente sin alterar significativamente sus características de solubilidad y toxicidad. Además, la identidad de los componentes codisolventes puede variar: p. ej., se pueden usar otros tensioactivos en lugar de Polysorbate 80™; el tamaño de la fracción de polietilenglicol puede variar; otros polímeros biocompatibles pueden reemplazar al polietilenglicol, p. ej., polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir a la dextrosa.

20 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en este documento se prepara para administración oral. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se preparan para administración bucal.

25 En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica para administración por inyección (p. ej., intravenosa, subcutánea, intramuscular, etc.). En ciertas de tales realizaciones, una composición farmacéutica comprende un vehículo y se formula en solución acuosa, tal como agua o tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hanks, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico. En ciertas realizaciones, se incluyen otros ingredientes (p. ej., ingredientes que ayudan en la solubilidad o sirven como conservantes). En ciertas realizaciones, las suspensiones inyectables se preparan usando vehículos líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección se presentan en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en envases multidosis. Ciertas composiciones farmacéuticas para inyección son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Ciertos disolventes adecuados para su uso en composiciones farmacéuticas para inyección incluyen, pero no se limitan a, disolventes lipofílicos y aceites grasos, tales como aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato o triglicéridos de etilo, y liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, tales suspensiones también pueden contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los agentes farmacéuticos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

40 En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica para administración transmucosa. En ciertas de tales realizaciones, se usan penetrantes apropiados para la barrera a ser permeada en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

45 En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica proporcionada en este documento comprende un oligonucleótido en una cantidad terapéuticamente efectiva. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva es suficiente para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de una enfermedad o para prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de los expertos en la materia.

50 En ciertas realizaciones, uno o más oligonucleótidos modificados proporcionados aquí se formulan como un profármaco. En ciertas realizaciones, tras la administración in vivo, un profármaco se convierte químicamente en la forma biológicamente, farmacéutica o terapéuticamente más activa de un oligonucleótido. En ciertas realizaciones, los profármacos son útiles porque son más fáciles de administrar que la forma activa correspondiente. Por ejemplo, en ciertos casos, un profármaco puede estar más biodisponible (p. ej., a través de la administración oral) que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, un profármaco puede tener una solubilidad mejorada en comparación con la forma activa correspondiente. En ciertas realizaciones, los profármacos son menos solubles en agua que la forma activa correspondiente. En ciertos casos, tales profármacos poseen una transmisión superior a través de las membranas celulares, donde la solubilidad en agua es perjudicial para la movilidad. En ciertas realizaciones, un profármaco es un éster. En ciertas de tales realizaciones, el éster se hidroliza metabólicamente a ácido carboxílico tras la administración. En ciertos casos, el compuesto que contiene ácido carboxílico es la forma activa correspondiente. En ciertas realizaciones, un profármaco comprende un péptido corto (poliaminoácido) unido a un grupo ácido. En ciertas de tales realizaciones, el péptido se escinde tras la administración para formar la forma activa correspondiente.

65 En ciertas realizaciones, la presente descripción se refiere a composiciones y métodos para reducir la cantidad o actividad de un ácido nucleico diana en una célula. En ciertas realizaciones, la célula está en un animal. En ciertas

realizaciones, el animal es un mamífero. En ciertas realizaciones, el animal es un roedor. En ciertas realizaciones, el animal es un primate. En ciertas realizaciones, el animal es un primate no humano. En ciertas realizaciones, el animal es un humano.

5 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para administrar una composición farmacéutica que comprende un compuesto oligomérico de la presente invención a un animal. Las vías de administración adecuadas incluyen, pero no se limitan a, oral, rectal, transmucosal, intestinal, enteral, tópica, supositorios, por inhalación, intratecal, intracerebroventricular, intraperitoneal, intranasal, intratumoral y parenteral (p. ej., intravenoso, intramuscular, intramedular, y subcutáneo). En ciertas realizaciones, los intratecales farmacéuticos se administran para lograr exposiciones locales en lugar de sistémicas. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden inyectarse directamente en el área del efecto deseado (p. ej., en los oídos).

15 En ciertas realizaciones, se administra una composición farmacéutica a un animal que tiene al menos un síntoma asociado con la enfermedad de Batten. En ciertas realizaciones, dicha administración da como resultado la mejora de al menos un síntoma. En ciertas realizaciones, la administración de una composición farmacéutica a un animal da como resultado un aumento de la proteína CLN3 funcional en una célula. En ciertas realizaciones, la administración de ciertos oligonucleótidos antisentido retrasa el inicio de la enfermedad de Batten. En ciertas realizaciones, la administración de ciertos oligonucleótidos antisentido previene la aparición de la enfermedad de Batten. En ciertas realizaciones, la administración de ciertos oligonucleótidos antisentido rescata el fenotipo celular.

#### 20 Divulgación no limitativa

Si bien ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solo para ilustrar los compuestos descritos en el presente documento y no pretenden limitarlos. Cada una de las referencias, números de acceso de GenBank y similares enumerados en la presente solicitud se incorpora aquí como referencia en su totalidad. Aunque la lista de secuencias que acompaña a esta presentación identifica cada secuencia como "ARN" o "ADN" según se requiera, en realidad, esas secuencias pueden modificarse con cualquier combinación de modificaciones químicas. Un experto en la materia apreciará fácilmente que dicha designación como "ARN" o "ADN" para describir oligonucleótidos modificados es, en ciertos casos, arbitraria. Por ejemplo, un oligonucleótido que comprende un nucleósido que comprende un resto de azúcar 2'-OH y una base de timina podría describirse como un ADN que tiene un azúcar modificado (2'-OH para el 2'-H natural de ADN) o como un ARN que tiene una base modificada (timina (uracilo metilado) para uracilo natural de ARN).

35 Por consiguiente, las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento, que incluyen, pero no se limitan a las de la lista de secuencias, pretenden abarcar ácidos nucleicos que contienen cualquier combinación de ARN y/o ADN natural o modificado, que incluye, pero no se limita a dichos ácidos nucleicos que tienen nucleobases modificadas. A modo de ejemplo adicional y sin limitación, un compuesto oligomérico que tiene la secuencia de nucleobase "ATCGATCG" abarca cualquier compuesto oligomérico que tenga dicha secuencia de nucleobase, ya sea modificada o no modificada, incluidos, entre otros, tales compuestos que comprenden bases de ARN, como los que tienen la secuencia "AUCGAUCG" y aquellos que tienen algunas bases de ADN y algunas bases de ARN como "AUCGATCG" y compuestos oligoméricos que tienen otras bases modificadas o de origen natural, tales como "AT<sup>me</sup>C GAUCG", en donde <sup>me</sup>C indica una base de citosina que comprende un grupo metilo en la posición 5.

#### 45 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos ilustran ciertas realizaciones de la presente invención y no son limitantes. Además, cuando se proporcionan realizaciones específicas, los inventores han contemplado la aplicación genérica de esas realizaciones específicas. Por ejemplo, la divulgación de un oligonucleótido que tiene un motivo particular proporciona un soporte razonable para oligonucleótidos adicionales que tienen el mismo motivo o un motivo similar. Y, p. ej., cuando una modificación particular de alta afinidad aparece en una posición particular, otras modificaciones de alta afinidad en la misma posición se consideran adecuadas, a menos que se indique lo contrario.

#### 55 **Ejemplo 1: Síntesis de oligonucleótidos antisentido**

La preparación de fosforamiditas de nucleósidos se realiza siguiendo procedimientos que se ilustran ampliamente en la técnica, tales como, entre otros, la Patente de Estados Unidos 6,426,220 y la solicitud PCT publicada WO 02/36743.

#### 60 *Síntesis de oligonucleótidos y oligonucleósidos*

Los compuestos oligoméricos utilizados de acuerdo con esta invención pueden prepararse de manera conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis es vendido por varios proveedores, incluidos, p. ej., Applied Biosystems (Foster City, CA). Cualquier otro medio para tal síntesis conocido en la técnica puede emplearse adicional o alternativamente. Es bien sabido usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

Oligonucleótidos: los oligonucleótidos de fosfodiéster sustituido y no sustituido (P=O) se sintetizan en un sintetizador de ADN automatizado (modelo 394 de Applied Biosystems) utilizando química estándar de fosforamidita con oxidación con yodo.

5 Los fosforotioatos (P=S) se sintetizan de manera similar a los oligonucleótidos de fosfodiéster con las siguientes excepciones: la tiación se realizó utilizando una solución al 10% p/v de 3,4-dihidro-2H-benzoditiol-3-ona 1,1-dióxido en acetonitrilo para la oxidación de los enlaces de fosfito. El tiempo del paso de reacción de tiación se incrementó a 180 segundos y fue precedido por el paso de tapado normal. Después de la escisión de la columna de CPG y el desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55°C (12-16 h), los oligonucleótidos se recuperaron precipitando con >3 volúmenes de etanol de una solución 1 M NH<sub>4</sub>OAc. Los oligonucleótidos de fosfinato se preparan como se describe en la Patente de EE.UU. 5,508,270.

Los oligonucleótidos de alquilfosfonato se preparan como se describe en la Patente de EE.UU. 4,469,863.

15 Los oligonucleótidos de 3'-desoxi-3'-metilfosfonato se preparan como se describe en las patentes de los Estados Unidos 5,610,289 o 5,625,050.

Los oligonucleótidos de fosforamidita se preparan como se describe en la Patente de EE.UU. 5,256,775 o la Patente de EE.UU. 5,366,878.

20 Los oligonucleótidos de alquilfosfonotioato se preparan como se describe en las solicitudes PCT publicadas PCT/US94/00902 y PCT/US93/06976 (publicadas como WO 94/17093 y WO 94/02499, respectivamente).

25 Los oligonucleótidos de 3'-desoxi-3'-amino fosforamidato se preparan como se describe en la Patente de EE.UU. 5,476,925.

Los oligonucleótidos de fosfotriéster se preparan como se describe en la Patente de Estados Unidos 5,023,243.

30 Los oligonucleótidos de fosfato de borano se preparan como se describe en las patentes de EE.UU. 5,130,302 y 5,177,198.

35 Oligonucleósidos: oligonucleósidos unidos a metilenoetilimino, también identificados como oligonucleósidos unidos a MMI, oligonucleósidos unidos a metilendimetilhidrazo, también identificados como oligonucleósidos unidos a MDH y oligonucleósidos unidos a metilencarbonilamo, también identificados como oligonucleósidos unidos a amida-3, y oligonucleósidos unidos a metilenoaminocarbonilo, también identificados como oligonucleósidos unidos a amida-4, también identificados como oligonucleósidos unidos a metilenoaminocarbonilo. Los oligonucleósidos, así como los compuestos oligoméricos de cadena principal mixtos que tienen, p. ej., enlaces MMI alternos y P=O o P=S se preparan como se describe en las patentes de los Estados Unidos 5,378,825, 5,386,023, 5,489,677, 5,602,240 y 5,610,289.

40 Los oligonucleósidos unidos a formacetal y tioformacetal se preparan como se describe en las patentes de los Estados Unidos 5,264,562 y 5,264,564.

Los oligonucleósidos unidos a óxido de etileno se preparan como se describe en la Patente de Estados Unidos 5,223,618.

45 *Aislamiento de oligonucleótidos*

50 Después de la escisión del soporte sólido de vidrio de poro controlado y el desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55°C durante 12-16 horas, los oligonucleótidos u oligonucleósidos se recuperan por precipitación de 1 M NH<sub>4</sub>OAc con >3 volúmenes de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados se analizaron mediante espectroscopía de masas con electrospray (determinación de peso molecular) y por electroforesis en gel capilar y se juzga que es al menos 70% de material de longitud completa. Las cantidades relativas de enlaces de fosforotioato y fosfodiéster obtenidos en la síntesis se determinaron por la relación del peso molecular correcto con respecto al producto -16 amu (+/- 32 +/- 48). Para algunos estudios, los oligonucleótidos se purificaron por HPLC, como describen Chiang et al., J. Biol. Chem 1991, 266, 18162-18171. Los resultados obtenidos con material purificado por HPLC fueron similares a los obtenidos con material no purificado por HPLC.

*Síntesis de oligonucleótidos - formato de placa de 96 pocillos*

60 Los oligonucleótidos pueden sintetizarse a través de la química de fosforamidita en fase sólida P(III) en un sintetizador automático capaz de ensamblar 96 secuencias simultáneamente en un formato de 96 pocillos. Los enlaces internucleotídicos de fosfodiéster se obtienen por oxidación con yodo acuoso.

65 Los enlaces internucleotídicos de fosforotioato se generan por sulfuración utilizando 3,4-dihidro-2H-benzoditiol-3-ona 1,1-dióxido (reactivo de Beauclage) en acetonitrilo anhidro. Los beta-cianoetilo-diiso-propilo fosforamiditos estándar protegidos con base se adquieren de proveedores comerciales (p. ej., PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, o

Pharmacia, Piscataway, NJ). Los nucleósidos no estándar se sintetizan según métodos estándar o patentados. Se utilizan como bases protegidas con beta-cianoetildiisopropilo fosforamiditas.

Los oligonucleótidos se escinden del soporte y se desprotegen con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado a temperatura elevada (55-60°C) durante 12-16 horas y el producto liberado se seca al vacío. El producto seco se resuspende luego en agua estéril para proporcionar una placa maestra a partir de la cual se diluyen todas las muestras analíticas y de placa de prueba utilizando pipetas robóticas.

#### Análisis de oligonucleótidos con formato de placa de 96 pocillos

La concentración de oligonucleótidos en cada pocillo se evalúa mediante dilución de muestras y espectroscopía de absorción UV. La integridad total de los productos individuales se evalúa mediante electroforesis capilar (EC) en el formato de 96 pocillos (Beckman P/ACE™ MDQ) o, para muestras preparadas individualmente, en un aparato comercial EC (p. ej., Beckman P/ACE™ 5000, ABI 270). La composición de la base y el esqueleto se confirma mediante análisis de masa de los compuestos oligoméricos utilizando espectroscopía de masa con electrospray. Todas las placas de prueba de ensayo se diluyen de la placa maestra utilizando pipetas robóticas de uno o varios canales. Se considera que las placas son aceptables si al menos el 85% de los compuestos oligoméricos en la placa tienen al menos el 85% de longitud completa.

#### Ejemplo 2: Expresión de CLN3Δ678 y CLN3Δ78 *in vitro*

Los plásmidos que comprenden un gen CLN3 WT o mutante C-terminal marcado con FLAG se prepararon usando técnicas estándar de biología molecular. Los genes mutantes CLN3 contenían una delección de los exones 6, 7 y 8 (CLN3Δ678) o una delección de los exones 7, 8 y 9 (CLN3Δ789). Los genes WT y CLN3 mutantes estaban bajo control del promotor CMV. Las células HeLa se transfectaron con plásmidos que contenían WT CLN3, CLN3Δ78, (XN3Δ678) o plásmidos vacíos (simulacro) utilizando métodos estándar. 48 horas después de la transfección, las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpo anti-FLAG M2 FITC (F4049, Sigma), montado con Prolong antifade con DAPI (Invitrogen) y visualizado bajo un microscopio confocal Olympus FV10i.

Si bien ninguna de las células transfectadas simuladas o CLN3Δ78 exhibieron fluorescencia FITC, muchas de las células transfectadas WT CLN3 y CLN3Δ678 eran fluorescentes en el canal FITC. Estos resultados indican que la proteína CLN3Δ78 no se expresó visiblemente, pero las proteínas CLN3 y CLN3Δ678 de tipo salvaje se expresaron visiblemente.

#### Ejemplo 3: Modulación antisentido de empalme de transcripción de CLN3

Gene Tools, LLC sintetizó un oligonucleótido antisentido dirigido a la unión del exón 6/intrón 6 del pre-ARNm de CLN3 humano (MO-ASO ACACAGAACCACACACTCACCACAC, SEQ ID NO: 3) y probó su capacidad para modular el empalme de CLN3. El ASO se dirige a la unión del exón 6/intrón 6 del complemento del número de acceso GENBANK NT\_010393.16 truncado de los nucleótidos 28427600 a 28444620 (SEQ ID NO: 1). El ASO es un ASO morfolino uniforme.

Se agregaron 0  $\mu\text{M}$ , 7,5  $\mu\text{M}$ , 15  $\mu\text{M}$  del ASO morfolino dirigido a la unión del exón 6/intrón 6 (MO-ASO) y el reactivo de transfección de portador Endo (Gene Tools, LLC) a las células de fibroblastos de un paciente JNCL homocigoto para la mutación CLN3Δ78, un portador heterocigoto de la mutación CLN3Δ78, y un miembro de la familia del paciente JNCL que es homocigoto para WT CLN3. Después de 48 horas, se aisló el ARN total de las células y se detectó el ARNm de CLN3 mediante RT-PCR radiactiva y PAGE. El gel se muestra en la Figura 2. Las bandas se cuantificaron mediante análisis de densitometría usando el software Image J, y los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación. En la Tabla 1, 'Ht' significa heterocigoto y 'Hm' significa homocigoto.

En un experimento similar, se incubaron concentraciones crecientes de MO-ASO con fibroblastos homocigotos de pacientes CLN3Δ78/Δ78. La dosis más baja de 25 nM indujo % de omisión del exón 6, y las dosis más altas probadas indujeron % de omisión del exón 6. Los resultados se muestran en Tabla 2 a continuación, y el gel se muestra en la Figura 3.

**Tabla 1: Modulación del empalme de pre-ARNm de CLN3 por MO-ASO según lo analizado por RT-PCR**

Genotipo	Concentración MO-ASO	% de todas las Isoformas que carecen de Exón 6
WT	0 $\mu\text{M}$ (control no tratado)	0,0
WT	7,5 $\mu\text{M}$	67,9
WT	15 $\mu\text{M}$	73,7
Ht	0 $\mu\text{M}$ (control no tratado)	0,0
Ht	7,5 $\mu\text{M}$	92,8
Ht	15 $\mu\text{M}$	93,4

(Continuación)

Genotipo	Concentración MO-ASO	% de todas las Isoformas que carecen de Exón 6
Hm	0 $\mu$ M (control no tratado)	0,0
Hm	7,5 $\mu$ M	74,6
Hm	15 $\mu$ M	93,3

**Tabla 2: Análisis de respuesta a la dosis de MO-ASO del empalme pre-ARNm de CLN3 en células CLN3 $\Delta$ 78/ $\Delta$ 78**

Concentración MO-ASO	% de todas las Isoformas que carecen de Exón 6
0 nM (control no tratado)	4,0
25 nM	82,9
50 nM	94,5
100 nM	89,7
200 nM	98,4
400 nM	99,4

Los niveles de proteína CLN3 se midieron en un experimento similar en donde se usó una concentración única (7,5  $\mu$ M) de MO-ASO o un oligonucleótido morfolino de control (MO-C, AGCTGATCATATTCTACCTGGTGCT SEQ ID NO: 62) y niveles de proteína en células CLN3 $\Delta$ 78 mutantes homocigóticas se analizaron a las siguientes 0, 56, 144 o 192 horas después de la incubación. Los niveles de proteína se analizaron mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-CLN3 (Proteintech) y anti-actina como control de carga. La mancha se muestra en la Figura 4.

#### Ejemplo 4: Diseño de oligonucleótidos antisentido para la inducción de la omisión del exón 6 de CLN3

Los oligonucleótidos antisentido complementarios al exón 6 y/o los intrones que flanquean al exón 6 de la transcripción de ARNm pre-ARNm de CLN3 se sintetizaron y probaron su capacidad para modular el empalme de CLN3 saltando exón 6. Los oligonucleótidos en la Tabla 3 a continuación están modificados uniformemente en 2'-MOE, y todos los enlaces internucleosídicos son enlaces de fosforotioato. Las bases de citosina son 5-metilcitosina. Los ASO se dirigen al complemento del número de acceso GENBANK NT 039433,8, truncado de los nucleótidos 44319075 a 44333955 (SEQ ID NO: 2), y las secuencias de ASO se enumeran en la Tabla 3 a continuación. Los sitios de inicio y finalización asociados con cada oligonucleótido son las posiciones 5' y 3', respectivamente, de la porción de SEQ ID NO: 2 que es complementaria al ASO.

**Tabla 3: Oligonucleótidos antisentido para la inducción de saltos de exón 6 de CLN3**

ISIS Nº	Sitio de inicio	Sitio de parada	Secuencia (5' a 3')	Región diana CLN3	SEQ ID NO
616693	5030	5047	GAGAAGAGATGAGGAGGA	Intrón 5	4
616694	5034	5051	GGCTGAGAAGAGATGAGG	Intrón 5/Exón 6	5
616695	5035	5052	GGGCTGAGAAGAGATGAG	Intrón 5/Exón 6	6
616696	5052	5069	CACTGACGAGCACCCGGG	Exón 6	7
616697	5053	5070	CCACTGACGAGCACCCGG	Exón 6	8
616698	5054	5071	TCCACTGACGAGCACCCG	Exón 6	9
616699	5058	5075	AAACTCCACTGACGAGCA	Exón 6	10
616700	5062	5079	GAACAACTCCACTGACG	Exón 6	11
616701	5066	5083	AGCAGAACAACCTCCACT	Exón 6	12
616702	5070	5087	TCCAGCAGAACAACCTC	Exón 6	13
616703	5074	5091	AAGCTCCCAGCAGAACAA	Exón 6	14
616704	5078	5095	AACAAAGCTCCCAGCAGA	Exón 6	15
616705	5082	5099	CCAGAACAAGCTCCCAG	Exón 6	16
616706	5086	5103	GCAACCAGAACAAGCTC	Exón 6	17
616707	5090	5107	GAAGGCAACCAGAACAAA	Exón 6	18
616708	5094	5111	GAGAGAAGGCAACCAGAA	Exón 6	19
616709	5098	5115	GACTGAGAGAAGGCAACC	Exón 6	20
616710	5102	5119	CACTGACTGAGAGAAGGC	Exón 6	21
616711	5106	5123	ACCCCACTGACTGAGAGA	Exón 6	22
616712	5110	5127	CTTAACCCCACTGACTGA	Exón 6	23
616713	5114	5131	CAGGCTTAACCCCACTGA	Exón 6	24
616714	5118	5135	CACACAGGCTTAACCCCA	Exón 6	25

(Continuación)

ISIS Nº	Sitio de inicio	Sitio de parada	Secuencia (5' a 3')	Región diana CLN3	SEQ ID NO
616715	5122	5139	TCACCACACAGGCTTAAC	Exón 6/Intrón 6	26
616716	5126	5143	GTAATCACCACACAGGCT	Exón 6/Intrón 6	27
616717	5130	5147	CTTCGTAATCACCACACA	Exón 6/Intrón 6	28
616718	5134	5151	CCAGCTTCGTAATCACCA	Exón 6/Intrón 6	29
616719	5138	5155	TCTCCCAGCTTCGTAATC	Intrón 6	30

**Ejemplo 5: Inducción de oligonucleótidos antisentido de omisión de CLN3 Exón 6 Salto *in vitro***

Para probar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para modular el empalme omitiendo el exón 6, la línea celular de ratón 208ee, derivada del riñón de ratón C57/B16, se transfeció con 50 nM de los ASO enumerados en la Tabla 3 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células de control no tratadas no recibieron ASO ni Lipofectamine, mientras que las células transfectadas simuladas recibieron solo Lipofectamine. Después de 48 horas, se recogió el ARN total de las células y se usó RT-PCR para identificar los transcritos de CLN3 de longitud completa y CLN3A6. Los productos de PCR se analizaron por PAGE y se cuantificaron por análisis de fosforimager (Typhoon 9400, GE Healthcare). El gel se muestra en la Figura 5, y los resultados se muestran en la Tabla 4 a continuación como el porcentaje de transcripción omitida del exón 6 ( $\Delta 6$ ) del total de transcripciones omitidas de longitud completa (FL) más exón 6. Las intensidades de banda se informan en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Este ejemplo ilustra que muchos ASO inducen la omisión del exón 6 de CLN3.

**Tabla 4: Inducción de omisión de CLN3 Exón 6 *in vitro***

ISIS NO	Longitud completa CLN3 (RFU)	CLN3 $\Delta 6$ (RFU)	$\Delta 6/(FL + \Delta 6)(\%)$
control no tratado	6.823.783	762	0,01
simulación	5.188.149	2.110	0,04
616693	6.723.467	253.542	3,63
616694	5.083.972	703.577	12,16
616695	6.278.156	225.133	3,46
616696	5.488.331	941.697	14,65
616697	3.262.413	1.067.086	24,65
616698	5.125.340	688.277	11,84
616699	4.999.204	727.472	12,70
616700	3.286.457	523.332	13,74
616701	4.054.613	653.463	13,88
616702	4.047.520	73.846	1,79
616703	4.452.892	96.627	2,12
616704	7.603.794	152.903	1,97
616705	2.177.616	1.254.116	36,54
616706	2.222.239	903.504	28,91
616707	2.432.817	1.009.358	29,32
616708	1.182.124	1.120.453	48,66
616709	894.622	1.501.534	62,66
616710	2.315.933	1.597.682	40,82
616711	4.134.353	640.071	13,41
616712	3.928.470	229.565	5,52
616713	5.499.952	56.355	1,01
616714	3.618.665	180.643	4,75
616715	5.176.194	235.685	4,35
616716	692.245	335.115	32,62
616717	2.855.386	512.449	15,22
616718	730.706	832.631	53,26
616719	1.738.032	856.673	33,02

**Ejemplo 6: Diseño de oligonucleótidos antisentido para la inducción de omisión de CLN3 exón 9**

Los oligonucleótidos antisentido complementarios al exón 9 y/o los intrones que flanquean al exón 9 del transcrito de pre-ARNm CLN3 de ratón se sintetizaron y probaron su capacidad para modular el empalme de CLN3 omitiendo el exón 9. Los oligonucleótidos se modificaron uniformemente para contener 2'-MOE, y todos los enlaces internucleosídicos son enlaces de fosforotioato. Las bases de citosina son 5-metilcitosina. Los ASO se dirigen al complemento del número de acceso GENBANK NT\_039433.8 truncado de los nucleótidos 44319075 a 44333955 (SEQ ID NO: 2) y las secuencias de ASO se enumeran en la Tabla 5 a continuación. Los sitios de inicio y finalización

asociados con cada oligonucleótido son las posiciones 5' y 3', respectivamente, de la porción de SEQ ID NO: 2 que es complementaria al ASO.

**Tabla 5: Oligonucleótidos antisentido para la inducción de omisión de CLN3 Exón 9**

3	Sitio de inicio	Sitio de parada	Secuencia (5' a 3')	Región diana CLN3	SEQ ID NO
616720	7338	7355	GGGATGGAATGGAGAAGC	Intrón 8	31
616721	7342	7359	AGCTGGGATGGAATGGAG	Intrón 8/Exón 9	32
616722	7346	7363	AAATAGCTGGGATGGAAT	Intrón 8/Exón 9	33
616723	7350	7367	CAAGAAATAGCTGGGATG	Intrón 8/Exón 9	34
616724	7354	7371	GCAACAAGAAATAGCTGG	Intrón 8/Exón 9	35
616725	7358	7375	GTGAGCAACAAGAAATAG	Exón 9	36
616726	7362	7379	AGACGTGAGCAACAAGAA	Exón 9	37
616727	7366	7383	CAGGAGACGTGAGCAACA	Exón 9	38
616728	7370	7387	GGTTCAGGAGACGTGAGC	Exón 9	39
616729	7371	7388	GGGTTTCAGGAGACGTGAG	Exón 9	40
616730	7387	7404	CCCCTCCAGGGTCCAGGG	Exón 9	41
616731	7390	7407	TTTCCCCTCCAGGGTCCA	Exón 9	42
616732	7394	7411	TCGTTTTCCCCTCCAGGG	Exón 9	43
616733	7398	7415	TGCTCGTTTTCCCCTCC	Exón 9	44
616734	7402	7419	TCTCTGCCTCGTTTTCCC	Exón 9	45
616735	7406	7423	GCAGTCTCTGCCTCGTTT	Exón 9	46
616736	7410	7427	GGCAGCAGTCTCTGCCTC	Exón 9	47
616737	7414	7431	GCCGGGCAGCAGTCTCTG	Exón 9	48
616738	7418	7435	GGCTGCCGGGCAGCAGTC	Exón 9	49
616739	7422	7439	GAGAGGCTGCCGGGCAGC	Exón 9	50
616740	7426	7443	CTATGAGAGGCTGCCGGG	Exón 9	51
616741	7430	7447	GTGCCTATGAGAGGCTGC	Exón 9	52
616742	7434	7451	CTCGGTGCCTATGAGAGG	Exón 9	53
616743	7438	7455	GGGTCTCGGTGCCTATGA	Exón 9	54
616744	7454	7471	CCTGGCTTTGACTCTGGG	Exón 9/Intrón 9	55
616745	7458	7475	CCTACCTGGCTTTGACTC	Exón 9/Intrón 9	56
616746	7462	7479	GCATCCTACCTGGCTTTG	Exón 9/Intrón 9	57
616747	7466	7483	CTTTGCATCCTACCTGGC	Exón 9/Intrón 9	58
616748	7470	7487	GGGCCTTTGCATCCTACC	Exón 9/Intrón 9	59
616749	7474	7491	GGGAGGGCCTTTGCATCC	Intrón 9	60

**Ejemplo 7: Inducción de oligonucleótidos antisentido de omisión de CLN3 Exón 9 *in vitro***

Para probar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para modular el empalme omitiendo el exón 9, la línea celular de ratón 208ee, derivada del riñón de ratón C57/B16, se transfectó con 50 nM de los ASO enumerados en la Tabla 5 usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células de control no tratadas no recibieron ASO ni Lipofectamine, mientras que las células transfectadas simuladas recibieron solo Lipofectamine. Después de 48 horas, se recogió el ARN total de las células y se usó RT-PCR para identificar los transcritos de CLN3 de longitud completa y CLN3A9. Los productos de PCR se analizaron por PAGE y se cuantificaron por análisis de fosforimager (Typhoon 9400, GE Healthcare). El gel se muestra en la Figura 6, y los resultados se muestran en la Tabla 6 como el porcentaje de transcripción omitida del exón 9 ( $\Delta 9$ ) de la transcripción total omitida de longitud completa (FL) más exón 9. Las intensidades de banda se informan en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Este ejemplo ilustra que muchos ASO inducen la omisión del exón 9 de CLN3.

**Tabla 6: Inducción de omisión de CLN3 Exon 9 *in vitro***

ISIS NO	CLN3 de longitud completa (RFU)	CLN3 $\Delta$ 9 (RFU)	$\Delta 9$ /(FL + $\Delta 9$ ) (%)
control no tratado	9.181.862	123.203	1,32
simulación	11.512.749	112.061	0,96
616720	8.594.979	360.150	4,02
616721	8.065.276	236.557	2,85
616722	9.180.522	336.620	3,54
616723	9.434.304	341.373	3,49
616724	8.253.838	790.632	8,74
616725	7.304.964	704.209	8,79
616726	7.557.368	1.175.984	13,47

(Continuación)

	ISIS NO	CLN3 de longitud completa (RFU)	CLN3Δ9 (RFU)	Δ9/(FL + Δ9) (%)
5	616727	5.415.612	3.045.762	36,00
	616728	4.294.429	3.391.413	44,13
	616729	5.530.907	2.760.074	33,29
	616730	5.419.114	2.431.785	30,97
	616731	8.003.964	792.062	9,00
10	616732	5.661.965	3.374.571	37,34
	616733	8.423.448	221.903	2,57
	616734	7.865.161	226.765	2,80
	616735	7.533.174	1.036.100	12,09
	616736	8.566.723	261.101	2,96
15	616737	7.177.269	1.539.887	17,67
	616738	9.536.684	433.505	4,35
	616739	10.062.225	213.983	2,08
	616740	9.458.260	522.205	5,23
	616741	9.741.862	294.485	2,93
20	616742	6.988.392	1.994.800	22,21
	616743	7.293.927	1.125.023	13,36
	616744	6.063.867	2.719.387	30,96
	616745	7.885.435	1.812.122	18,69
	616746	6.220.132	3.850.348	38,23
25	616747	6.181.617	3.699.891	37,44
	616748	7.778.346	2.210.461	22,13
	616749	10.815.904	467.192	4,14

**30 Ejemplo 8: Inducción de oligonucleótidos antisentido de omisión de CLN3 exón 6 en ratones Batten *in vivo***

Se ha descrito un modelo de ratón de la enfermedad de Batten, en donde la delección CLN3Δ78 se aplica a ratones C57/BL6J (Cotman et al., Hum. Molec. Genet. (2002) 11, 2709-2721). Los ratones homocigotos CLN3Δ78/Δ78 exhiben gliosis en el SNC, rastros de marcha anormales, comportamiento de apriete que indica neurodegeneración y principios de PT-10.

20 μg de Isis N° 616709 (ver Tabla 3) o un control ASO, Isis N° 527134 (AGCTGATCATATTCTACC SEQ ID NO: 61) que es 2'-MOE uniforme y contiene enlaces internucleosídicos de fosforotioato uniformes, se administró a grupos de seis (ratones CLN3Δ78/Δ78 para probar la capacidad de Isis N° 616709 para inducir la omisión del exón 6 *in vivo*. Los ASO fueron administrados por inyección intracerebroventricular (inyección de ICV) en el día postnatal uno o dos. Cuatro meses después de la inyección de ICV, los ratones fueron sacrificados y el ARN fue aislado del tejido cerebral. Las transcripciones CLN3Δ78 y CLN3Δ678 se analizaron mediante RT-PCR radiomarcada. Los productos de PCR se separaron por PAGE y se cuantificaron por análisis de fosforimager (Typhoon 9400, GE Healthcare). Se muestra un gel en la Figura 7 y los resultados para cada grupo se presentan en la Tabla 7 a continuación. Como se indica por los resultados en la Tabla 7 a continuación, Isis N° 616709 indujo la omisión del exón 6 de CLN3 en un modelo de ratón de la enfermedad de Batten *in vivo*.

**Tabla 7: Inducción de omisión de CLN3 Exon 6 en ratones CLN3Δ78/Δ78 *in vivo***

ISIS NO.	Δ678/ (Δ678 + Δ78) (%)	Des. Est.
527134	3,70	5,30
616709	33,72	7,18

**55 Ejemplo 9: Rescate de oligonucleótidos antisentido de coordinación motora en ratones CLN3Δ78/Δ78**

Para evaluar si los ASO que inducen la omisión del exón 6 alivian los síntomas de la enfermedad de Batten, los ratones homocigotos CLN3Δ78/Δ78 y heterocigotos CLN3 +/Δ78 se dividieron en grupos mixtos de género y machos y se trataron con 20 μg de Isis N° 616709 (SEQ ID NO. 20; ver Tabla 3), control ASO, Isis N° 527134 (SEQ ID NO: 61; ver Ejemplo 8), o ningún ASO (sin tratar). Los ASO se administraron mediante inyección intracerebroventricular en el día postnatal uno o dos. Dos o tres meses después de la inyección única, se midió la coordinación motora de cada ratón en función del tiempo que cada ratón pasó en un rotor rotativo acelerado. Los resultados se presentan en las Tablas 8-12 a continuación.

**65 Tabla 8: Tiempo empleado en un Rotarod acelerado por género mixto (ratones CLN3Δ78/Δ78, edad 2 meses**

Isis Nº	Genotipo	Nº de ratones en grupo	Tiempo promedio en Rotarod (segundos)	Des. Est.
No tratado	CLN3Δ78/Δ78	28	82,7	25,8
527134	CLN3Δ78/Δ78	21	81,5	20,8
616709	CLN3Δ78/Δ78	21	84,7	14,5
No tratado	CLN3+/Δ78	22	91,6	19,7
527134	CLN3+/Δ78	17	98,2	39,2
616709	CLN3+/Δ78	31	99,8	22,9

**Tabla 9: Tiempo empleado en un Rotarod acelerado por ratones de género mixto CLN3Δ78/Δ78, edad 3 meses**

Isis Nº	Genotipo	Nº de ratones en grupo	Tiempo promedio en Rotarod (segundos)	Des. Est.
No tratado	CLN3Δ78/Δ78	9	51,8	17,6
527134	CLN3Δ78/Δ78	8	66,1	15,3
616709	CLN3Δ78/Δ78	9	81,2	12,8
No tratado	CLN3+/Δ78	8	70,3	14,6
527134	CLN3+/Δ78	7	68,8	13,4
616709	CLN3+/Δ78	13	96,0	29,3

**Tabla 10: Tiempo empleado en un Rotarod acelerado por ratones macho CLN3Δ78/Δ78, edad 2 meses)**

Isis Nº	Genotipo	Nº de ratones en grupo	Tiempo promedio en Rotarod (segundos)	Des. Est.
No tratado	CLN3Δ78/Δ78	13	68,1	19,3
527134	CLN3Δ78/Δ78	5	74,3	15,2
616709	CLN3Δ78/Δ78	12	84,1	14,3
No tratado	CLN3+/Δ78	12	94,0	19,7
527134	CLN3+/Δ78	8	108,2	47,5
616709	CLN3+/Δ78	14	103,2	23,7

**Tabla 11: Tiempo invertido en un Rotarod acelerado por ratones macho CLN3Δ78/Δ78, edad 3 meses)**

Isis Nº	Genotipo	Nº de ratones en grupo	Tiempo promedio en Rotarod (segundos)	Des. Est.
No tratado	CLN3Δ78/Δ78	4	39,3	9,5
527134	CLN3Δ78/Δ78	1	36,4	n/a
616709	CLN3Δ78/Δ78	4	75,3	9,9
No tratado	CLN3+/Δ78	8	70,3	14,6
527134	CLN3+/Δ78	3	75,4	11,8
616709	CLN3+/Δ78	7	117,4	15,8

Los resultados en las Tablas 8-11 anteriores indican que el déficit de coordinación motora en los ratones Batten (CLN3Δ78/Δ78 empeora significativamente entre los dos y tres meses de edad y es más grave en los machos que en las hembras. Además, el tratamiento con Isis Nº 616709, que induce la omisión del exón 6, aumenta la cantidad de tiempo que los ratones Batten CLN3Δ78/Δ78 pueden gastar en un rotor rotativo acelerado, mejorando así un déficit de coordinación motora que es sintomático de la enfermedad de Batten.

#### **Ejemplo 10: Inducción de oligonucleótidos antisentido de omisión de CLN3 humano Exón 6 *in vitro***

Los oligonucleótidos antisentido complementarios al exón 6 y/o los intrones que flanquean al exón 6 del transcrito de pre-mPvNA de CLN3 humano se sintetizaron y probaron su capacidad para modular el empalme de CLN3 omitiendo el exón 6. Los oligonucleótidos en la Tabla 12 a continuación son uniformemente 2'-MOE modificado, y todos los enlaces internucleosídicos son enlaces de fosforotioato. Las bases de citosina son 5-metilcitosina. Los ASO se dirigen al complemento del número de acceso GENBANK NT\_010393.16, truncado de los nucleótidos 28427600 a 28444620 (SEQ ID NO: 1), y las secuencias de ASO se enumeran en la Tabla 12 a continuación. Los sitios de inicio y finalización asociados con cada oligonucleótido son las posiciones 5' y 3', respectivamente, de la porción de la SEQ ID NO:1 que es complementaria al ASO.

Para probar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para modular el empalme omitiendo el exón 6, los fibroblastos de pacientes humanos JNCL que son homocigotos para la delección CLN3 $\Delta$ 78 se transfectaron con 50 nM de un ASO usando reactivo de transfección con citofectina. Después de 48 horas, se recogió el ARN total de las células y se usó RT-PCR para identificar los transcritos de ARNm CLN3 $\Delta$ 78 y CLN3 $\Delta$ 678. Los productos de PCR se analizaron por PAGE y se cuantificaron por análisis de fosforimager (Typhoon 9400, GE Healthcare). El gel se muestra en la Figura 8, y los resultados se muestran en la Tabla 12 a continuación como las proporciones de la transcripción omitida ( $\Delta$ 678) del exón 6 y la transcripción omitida ( $\Delta$ 78) del exón 6, 7 y 8. Los resultados a continuación ilustran que muchos ASO indujeron la omisión del exón 6 de CLN3.

**Tabla 12: Omisión de CLN3 Exón 6 en fibroblastos de pacientes**

ISIS Nº	Sitio de inicio	Sitio de parada	Secuencia (5' a 3')	Región diana CLN3	CLN3 $\Delta$ 678/CLN3 $\Delta$ 78	SEQ ID NO
688546	5699	5716	ACTCTCAGCATCTCAGCC	Intrón 5	0,00	63
688547	5704	5721	TCTCTACTCTCAGCATCT	Intrón 5	0,00	64
688548	5709	5726	GTCGGTCTCTACTCTCAG	Intrón 5	0,25	65
688549	5714	5731	GGAAGTCTCGGTCTCTACT	Intrón 5	1,38	66
688550	5734	5751	GGTGAGAAGGGAAGGGAG	Intrón 5	0,37	67
688551	5764	5781	TCCCACTGACGAGAACCC	Exón 6	0,74	68
688552	5769	5786	ACAAATCCCACTGACGAG	Exón 6	1,58	69
688553	5774	5791	GCAGCACAAATCCCACTG	Exón 6	14,77	70
688554	5779	5796	TTCCAGCAGCACAAATCC	Exón 6	3,68	71
688555	5784	5801	GAAGCTTCCAGCAGCACA	Exón 6	31,07	72
688556	5789	5806	AGGACGAAGCTTCCAGCA	Exón 6	9,28	73
688557	5794	5811	CAACCAGGACGAAGCTTC	Exón 6	13,03	74
688558	5799	5816	AAAGGCAACCAGGACGAA	Exón 6	24,37	75
688559	5804	5821	TGAGAAAAGGCAACCAGG	Exón 6	10,29	76
688560	5809	5826	CAGAATGAGAAAAGGCAA	Exón 6	8,44	77
688561	5814	5831	CCCCACAGAATGAGAAAA	Exón 6	1,28	78
688562	5819	5836	CTGGTCCCCACAGAATGA	Exón 6	7,32	79
688563	5824	5841	ACAGGCTGGTCCCCACAG	Exón 6	8,32	80
688564	5829	5846	ACCACACAGGCTGGTCCC	Exón 6/Intrón 6	6,52	81
688565	5834	5851	CACTCACCACACAGGCTG	Exón 6/Intrón 6	4,56	82
688566	5839	5856	CCACACACTCACCACACA	Exón 6/Intrón 6	0,16	83
688567	5844	5861	CAGAACCACACACTCACC	Intrón 6	0,41	84
688568	5849	5866	TGACACAGAACCACACAC	Intrón 6	0,46	85
688569	5854	5871	CCATCTGACACAGAACCA	Intrón 6	0,33	86
688570	5859	5876	GCTCCCCATCTGACACAG	Intrón 6	0,27	87
688571	5879	5896	CTCTGATGTGGTTCCTCG	Intrón 6	0,11	88
688572	5884	5901	AAATGCTCTGATGTGGTT	Intrón 6	0,10	89
688573	5889	5906	CCCACAAATGCTCTGATG	Intrón 6	0,12	90

**Ejemplo 11: Inducción de oligonucleótidos antisentido de omisión de CLN3 humano Exón 9 *in vitro***

Los oligonucleótidos antisentido complementarios al exón 9 y/o los intrones que flanquean al exón 9 del transcrito de pre-ARNm de CLN3 humano se sintetizaron y probaron su capacidad para modular el empalme de CLN3 por omisión del exón 9. Los oligonucleótidos se modificaron uniformemente para contener 2'-MOE, y todos los enlaces internucleosídicos son enlaces de fosforotioato. Las bases de citosina son 5-metilcitosina. Los ASO se dirigen al complemento del número de acceso GENBANK NT\_010393.16, truncado de los nucleótidos 28427600 a 28444620 (SEQ ID NO: 1), y las secuencias de ASO se enumeran en la Tabla 13 a continuación. Los sitios de inicio y finalización asociados con cada oligonucleótido son las posiciones 5' y 3', respectivamente, de la porción de la SEQ ID NO:1 que es complementaria al ASO.

Para probar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para modular el empalme por omisión del exón 9, los fibroblastos de pacientes humanos JNCL que son homocigóticos para la delección de CLN3 $\Delta$ 78 se transfectaron con 50 nM de un ASO usando reactivo de transfección de citofectina o se transfectaron de forma simulada. Después de 48 horas, se recogió el ARN total de las células y se usó RT-PCR para identificar los transcritos de ARNm CLN3 $\Delta$ 78 y CLN3 $\Delta$ 789. Los productos de PCR se analizaron por PAGE y se cuantificaron por análisis de fosforimager (Typhoon 9400, GE Healthcare). El gel se muestra en la Figura 9, y los resultados se muestran en la Tabla 13 a continuación como las proporciones de la transcripción omitida ( $\Delta$ 789) del exón 7, 8 y la transcripción omitida ( $\Delta$ 78) del exón 7 y 8. Los resultados a continuación ilustran que muchos ASO indujeron la omisión del exón 9 de CLN3 en mayor medida

que la omisión del exón 9 observada en células simuladas transfectadas.

**Tabla 13: Omisión de CLN3 Exón 9 en fibroblastos de pacientes**

ISIS Nº	Sitio de inicio	Sitio de parada	Secuencia (5' a 3')	Región diana CLN3	CLN3Δ789/CLN3 Δ78	SEQ ID NO
simulación	n/a	n/a	n/a	n/a	0,05	n/a
688574	9122	9139	GGGAAGGTCCCCAGGGAC	Intrón 8	1,14	91
688575	9127	9144	TGGCTGGGAAGGTCCCCA	Intrón 8	48,56	92
688576	9132	9149	CCTACTGGCTGGGAAGGT	Intrón 8	1,59	93
688577	9137	9154	AAAACCCTACTGGCTGGG	Intrón 8	0,46	94
688578	9142	9159	GTCAGAAAACCCTACTGG	Intrón 8	0,46	95
688579	9147	9164	GCAGGGTCAGAAAACCCT	Intrón 8	0,89	96
688580	9152	9169	TGAAGGCAGGGTCAGAAA	Intrón 8	0,20	97
688581	9157	9174	TAGGATGAAGGCAGGGTC	Intrón 8	0,08	98
688582	9162	9179	AGGAGTAGGATGAAGGCA	Intrón 8	0,79	99
688583	9167	9184	TAGCTAGGAGTAGGATGA	Intrón 8/Exón 9	1,05	100
688584	9172	9189	AGAAATAGCTAGGAGTAG	Intrón 8/Exón 9	0,22	101
688585	9177	9194	CAACAAGAAATAGCTAGG	Intrón 8/Exón 9	0,08	102
616725	9182	9199	GTGAGCAACAAGAAATAG	Exón 9	0,29	36
688586	9187	9204	GAGATGTGAGCAACAAGA	Exón 9	0,24	103
688587	9192	9209	CTCAGGAGATGTGAGCAA	Exón 9	0,92	104
688588	9197	9214	TGGGCCTCAGGAGATGTG	Exón 9	2,73	105
688589	9202	9219	GGTCCTGGGCCTCAGGAG	Exón 9	2,73	106
688590	9207	9224	TCCAGGGTCTGGGCCTC	Exón 9	0,57	107
688591	9212	9229	TCCCTCCAGGGTCTGG	Exón 9	0,14	108
688592	9217	9234	CTTCTCCCCTCCAGGGT	Exón 9	0,23	109
688593	9222	9239	TGCTTCTTCTCCCCTCC	Exón 9	0,06	110
688594	9227	9244	CTCTCTGCTTCTTCTTCC	Exón 9	0,07	111
688595	9232	9249	CTGCGCTCTCTGCTTCTT	Exón 9	8,80	112
688596	9237	9254	CCGGGCTGCGCTCTCTGC	Exón 9	4,76	113
688597	9242	9259	GGCTGCCGGGCTGCGCTC	Exón 9	0,51	114
688598	9262	9279	GGGCCTCGGTTCTTATGA	Exón 9	3,74	115
688599	9282	9299	CCTACCTGGCTTCGACTC	Exón 9/Intrón 9	2,30	116
688600	9287	9304	TGTCTCCTACCTGGCTTC	Exón 9/Intrón 9	0,79	117
688601	9292	9309	GTCTGTGTCTCCTACCTG	Exón 9/Intrón 9	5,10	118
688602	9297	9314	TGAGGGTCTGTGTCTCCT	Intrón 9	1,75	119
688603	9302	9319	CTCTCTGAGGGTCTGTGT	Intrón 9	0,08	120
688604	9307	9324	GTGACCTCTCTGAGGGTC	Intrón 9	0,03	121
688605	9312	9329	AGAAAGTGACCTCTCTGA	Intrón 9	0,05	122
688606	9317	9334	GAGAAAGAAAGTGACCTC	Intrón 9	0,07	123
688607	9322	9339	CCAGAGAGAAAGAAAGTG	Intrón 9	0,05	124
688608	9327	9344	CAAACCCAGAGAGAAAGA	Intrón 9	0,08	125
688609	9332	9349	AAGGCCAAACCCAGAGAG	Intrón 9	0,02	126
688610	9337	9354	AGGAAAAGGCCAAACCCA	Intrón 9	0,01	127

**Ejemplo 12: Respuesta a la dosis de la inducción de oligonucleótidos antisentido de omisión de CLN3 exón humano**

Los fibroblastos del paciente JNCL se transfectaron con Isis Nº 688555, 688559 (ver Tabla 12), o Isis Nº 688595 (ver Tabla 13) a una concentración listada en la Tabla 14 a continuación usando el reactivo de transfección de portador de Endo (Gene Tools, LLC). Después de 48 horas, se aisló el ARN total de las células y se detectó el ARNm de CLN3

como se describe en los Ejemplos 10 y 11. El gel se muestra en la Figura 10. Los resultados se muestran en la Tabla 14 a continuación y muestran que los tres ASO probados indujeron la omisión del exón de manera dependiente de la dosis, "n/a" indica que el ASO no se probó a la concentración indicada.

5 **Tabla 14: Respuestas a la dosis de un ASO de omisión del exón 6 y un ASO de omisión del exón 9 las células del paciente**

Concentración (nM)	CLN3Δ678/CLN3Δ78		CLN3Δ789/CLN3Δ78 Isis N° 688595
	Isis N° 688555	Isis N° 688559	
0	0,00	0,01	0,04
0,39	0,37	n/a	n/a
0,78	1,13	n/a	n/a
1,56	4,31	n/a	n/a
3,125	15,24	n/a	n/a
12,5	n/a	3,46	3,84
25	n/a	7,36	19,34
50	n/a	11,88	23,16
100	n/a	23,66	21,31
200	n/a	70,91	27,9

25 **Ejemplo 13: Rendimiento en un laberinto de agua por ratones CLN3Δ78/Δ78 después del tratamiento ASO**

Para probar si un ASO que induce la omisión del exón 6 alivia los síntomas de la enfermedad de Batten, CLN3Δ78/Δ78 homocigoto, CLN3 +/A78 heterocigoto y ratones de tipo salvaje fueron tratados con 20 μg de Isis N° 616709 (ver Tabla 3), Isis No 527134 como control (véase el Ejemplo 8), o sin ASO (sin tratar). Los ASO se administraron mediante inyección intracerebroventricular en el día postnatal uno o dos. Dos o tres meses después de la inyección única, el rendimiento en el laberinto de agua de Morris se midió en función del tiempo que cada ratón tardó en nadar hasta una plataforma oculta. Los ratones se colocaron individualmente en una piscina circular, de 48 pulgadas de diámetro, llenada a una profundidad de 26 pulgadas con agua a 23°C. Las paredes de la piscina se hicieron opacas con pintura blanca y se colocaron en una habitación con señales prominentes de laberinto extra a 16 pulgadas del borde de la piscina. Se colocaron cuatro señales proximales únicas en la pared interior de la piscina de 8 cm de altura sobre el nivel del agua a 0, 90, 180 y 270 grados. Los ratones se colocaron en uno de los cuatro cuadrantes iniciales frente a la pared de la piscina y se les permitió nadar hasta descansar sobre una plataforma de plexiglás cuadrada de 4 pulgadas sumergida en 0,5 cm de agua, o hasta un máximo de 60 segundos. Al encontrar una plataforma, los ratones se quedaron allí durante 20 segundos antes de volver a ingresar en el siguiente punto de inicio o retirarlos de la jaula. Los ratones que no encontraron la plataforma en 60 segundos fueron guiados por el experimentador. Los ensayos se realizaron una vez en cada punto inicial del cuadrante por sesión. Los ratones se probaron durante cuatro días consecutivos con dos sesiones de cuatro ensayos cada uno por día, y se registró el tiempo para llegar a una plataforma oculta. Cada grupo de tratamiento consistió en 13-35 ratones. Los resultados para cada grupo de tratamiento se muestran en la Tabla 15 a continuación. Los resultados muestran que los ratones homocigotos CLN3Δ78/Δ78 que recibieron un oligonucleótido antisentido que induce la omisión del exón 6 se desempeñaron de manera similar a los ratones WT o heterocigotos y tuvieron un rendimiento significativamente mejor que los ratones homocigotos CLN3Δ78/Δ78 que no fueron tratados o recibieron el control ASO. En particular, las diferencias entre los ratones homocigotos CLN3Δ78/Δ78 de control y los ratones homocigotos CLN3Δ78/Δ78 tratados con ASO y los controles WT y heterocigotos fueron significativos, con valores de p <0,01 en los días 2 y 4.

50 **Tabla 15: Tiempo para llegar a una plataforma oculta en un laberinto de agua de Morris**

Isis N°	Genotipo	N° de ratones en el grupo	Día del ensayo	Tiempo a plataforma(s)	Des. Est.
No tratado	WT o CLN3+/Δ78	21	1	44,8	10,5
			2	24,9	12,0
			3	17,2	8,3
			4	13,5	7,6
No tratado o 527134	CLN3A78/A78	35	1	48,9	10,0
			2	35,9	14,5
			3	27,4	12,7
			4	26,0	14,2
616709	CLN3A78/A78	13	1	43,0	7,6
			2	19,3	7,5
			3	24,1	12,9
			4	16,8	8,4

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Isis Pharmaceuticals, Inc. Rosalind Franklin University of Medicine and Science	
5	<120> COMPUESTOS ANTISENTIDO Y USOS DE LOS MISMOS	
	<130> CORE0120WO	
10	<150> 61/910,871 <151> 2013-12-03	
	<160> 127	
15	<170> Patentin versión 3,5	
	<210> 1 <211> 17021 <212> ADN <213> Homo sapiens	
20	<400> 1	
	agcactttgg gaagccaagg caggtggatt gcttgagctc aggagtttga ggccaccctg	60
25	ggcaacgtgg caaaatccag tctctacaaa aaacacaaaa attagctggg cacagtgggtg	120
	cgcacctgct gtcccagcta ctcgaggaggc tgaggtggga ggatcacctg agcctgggag	180
30	gtcaaggttg cagcaacca agatcctgcc actgcactcc agcctgggca acagagcaaa	240
	accctgtcaa aaaaaaaaaa aaaatctggt ctaagcacca cctttgatgg aggcaggaat	300
	cctgcagcag cctggagcca acccaatggc tccctgcctc tggtgctcta tttcttatca	360
35	ccatacaggt ctctaaggtc acctttaggt ctaacattgt atgaatgatt gtcagcaact	420
	ttccaatttt tttcatatac atatattttt tttattttat tttttacttt ttcttttttt	480
40	gagacaggat ctactctgt caccaggct ggagtgcagt ggcgtgatca tagctcactg	540
	tagcttcaac ctctgggca caagtgatcc tcccacctca gcttccaagg tacctgtgac	600
	tacaggaatg cgccaccatg cccggctaata tttgttatat atatatatat atatatttgt	660
45	accttggttt tctcatctgt aacaccaggg gttgaagtgc tgtgatattt tttggttcta	720
	ggataatttg gaaataggga tctcttaaca tcttggatac tgccaataga tcattcacga	780
50	aatcccttta gatgagtgtt atgtttactt aggtctctaa aacaatttgt aaggtaaca	840
	gatggggata agaatgacct gaagctggtc gtctttgttc gcaaccagaa acagtcctgc	900
	ctcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaagggagta ggcaggtggc catatttgtt tctggcaagt	960
55	gagtgtgtaa ggaaaggagc tgaagcctcc cacagtcata actggtgctg gcaggctact	1020
	gtctcggctt tgggcgccac tgatctaagg tcacggctct gcttgctgct cccaccgct	1080
60	ccagtttaa acctgcggtt ccagggttct ccagcccctc cctttttcac gctccgaagc	1140
	cgagaaggcc caaagcgaag acagagagga cccggaagta gggaaaacct ctgagcacgt	1200
	gatgggggaa cacgagggtg ctgtcacgtg atccgacaaa cggcctctgc atagtgcaga	1260
65		

ES 2 797 679 T3

	acattctgct gctcttaaag gtacaggcct cagggctcct gctgtagacg gggcggggga	1320
	gagtacgatg ggtggggcgt ggtgggtcgt agggcgctcg agatggagcc cccagcttcc	1380
5	ttgatggatc gcggggcgcg agtgccttag acaagccgga gctgggaccg gcaatcgggc	1440
	gttgatcctt gtcacctgtc gcagaccctc atccctcccg tgggagcccc ctttgacac	1500
10	tctatgacct tggaccctcg ggggacctga acttgatgcg atgggaggct gtgcaggctc	1560
	gcggcggcgc ttttcggatt ccgagggatga gtattcccgc ccaccctcat ggaacgacca	1620
	cctctggctc gcagcccacc tgaggggaat gagagctgac tcggcccccg gaggacacgc	1680
15	aaggagcggc cgtgcacctg agagtaggtg ggggtcatgc cctcttctcg ctctcccagg	1740
	ggaggagacc gtcccggagc cccggctccc tctgttgac catcagggcg cgcattggaa	1800
	gaacgcggtg ggcttctggt gagtggcctg agacttcagc gagtgacaat ggcatgagaa	1860
20	gaggaagtg accggaggaa aggggaaga aagagttaag ctgcgcaaag gagctgaacc	1920
	cacaaatatt tactgaatcc actggtttgc cccaggggca gcatgtaaaa tttccaaact	1980
	tcactcctta tcacctccg gatttagcaa gatcctcata cctaccacct gtaggattat	2040
25	ttactttttt cttccagcca attcagcctt aacgtttttt agtgacata tttttaaaaa	2100
	gaaaacttta aatcacgact ccacttgaa aaccagcgtt ttcctagtga acgtttaaat	2160
30	aatgcatca ctactaaaac tttttatatt ttttaattta ttttatatta tcttatTTTT	2220
	TTTTTTTTT gagacagggt cttgctctgt ttcccagggt ggaatgcagt agtgcaatca	2280
	cagctccctg cagcctggaa ctctgggct caagtattc tcccacctca gcctccaagt	2340
35	agggtggct acaggtgtgc accaccgcat ctgcctaatt tttatatttt tttatagaga	2400
	tgggggtctc actatgggac ctgggctggt ctcaaactcg tggcctcaag tgatcctcct	2460
	acctcaacct tccaaagtgc tgagattaca agcatgagcc accatgccgg gcctgaacct	2520
40	TTTTTTTTT TTTTTTTTT gagacggagt ctctctctgt cctccaggct ggagtgcagt	2580
	ggcgcaatct cggctcactg caaactccgc ctcccagggt cacaccattc ttttgctca	2640
45	gcctccggag tagctgagac tacaggcgcc tgccaccacg cccggctatt tttttgtatt	2700
	tttagtagag atggggtttc accgcgttat ccaggatggt ctcgatctcc tgacctcgtg	2760
	atocgcccgc ctcgccctcc caaagtctg ggattacagg tgtgagccac cgcgccacg	2820
50	TTTTTTTTT TTTTTTTTta atttatattt atttttgaga cagagtctca ctctatcacc	2880
	caggctggag agcagtggca caatctcggc tcaactgaaac ctccacctcc aaggttcaag	2940
	ctattctcct gtctcagctc cccgagtagc tgggattaca ggtgcgtgcc accagacaca	3000
55	gctaattttt tgtattttta gtaaagacag gatttcacca tgttggtcag gctggtctag	3060
	aactcctgac cttaggtgat ccgcttgctt ccacttccca aagtgctggg attacaggcg	3120

60

65

ES 2 797 679 T3

5           tgagccaccg tgccccgcc tgacataggg gctttgggat cacagacttg gattcacttc       3180  
             cagcctccaa ggctctccc agaaactctc tgtgaccact ctcttttttt tttttttttt       3240  
 10          ttgagataga gtctcgctct tgtagcccag gctggagtgc aatggcacia tctcggctta       3300  
             ctgcaacctc cgcctttcgg gttcaagtgg ttctcctgcc tcagcctcct gagtagctag       3360  
             gattacaggc atgtgcaact tcgcccagct aattttgtat ttttttagtag agacgggggtt       3420  
 15          tctccatatt gctcaggctg gtctcgaact cctgacctca ggcgatccgc ccgcctcggc       3480  
             ccctcaaagt gctggaatta cagggtgtgag cactgcact cggcctcttc ctttttattt       3540  
             tttatttttg tgacagggtc ttgctctgtc acccaggcta gagtgcagtg gcatgatcac       3600  
             agttcactgc agcctctgac tcctggactc aagcaatcct cccacctcag cctcccaagt       3660  
             agctgggact acagtgcaag ccaccacacc tggctaattt ttaaattttt tgtagagatg       3720  
 20          ggggtctcac tatcttgccc aagcaccaaa gcctgtatth ttgaccccaa cattgaatga       3780  
             ggatgggatc tggatgata gggaaaaaaaa agagggggct gattgaaggc cacaggtaa       3840  
             ggaaggtttg gcacaaaggc tacagatggc tgcaggatga ggaggagggt gagacctgtc       3900  
 25          ctgctccttc caggctgctg ggcctttgca acaacttctc ttatgtggtg atgctgagtg       3960  
             ccgcccacga catccttagc cacaagagga catcgggaaa ccagagccat gtaagtgact       4020  
             ctctaccacc accaccatgg ttagtccctg tgggaagatg aggggggtgg acaaggtggg       4080  
 30          gtaaagtthc cagtctctgg ctgggcacag tggctcacac ctgtaatccc agcagtttg       4140  
             gaggtgagg cggcggatc acttgaagtc aggagtctga gaccagcctg gccaacatgg       4200  
 35          tgaaactccg actctactaa aaatacaaaa actacctggg tgtggtggca cacacctgta       4260  
             gtctgagcta ttcaggaggc tgaggcagga gaattgcttg aagccaggag gtggaagtth       4320  
             caatgagcca agatcacacc actgcactct agcttgggca acagagtgag acaccatctc       4380  
 40          aaaaaaaaa aagctcttga atgtgttatc taaacaaagt ccatttacag ggccatctgt       4440  
             ggcctgtggt ctagtagtgt gagactcata tggaaacccc ctcttcattg tgcattgaga       4500  
             gacgtgagg tcctgagaag tcagtactg ctgacccaaa gccatccttc aagtgaaggc       4560  
 45          agagctggga cgggagccag gctctgtgtg tctatccctc tgctccagg gtgaaagaca       4620  
             tgcttttctc ccattaggth gaccaggcc caacgcgat cccccacaac agctcatcac       4680  
             gattgactg caactctgtc tctacggctg tgcgtactca tctcacctgg tccttgctg       4740  
 50          accagggcc cctgggtcta tagaccac tcccagcct tcaactacca gctgggactg       4800  
             tcatgattaa aacagttgag acctgggctg ggcgcactgg ctcaacttg taatcccagc       4860  
 55          actttgggag accaaggthg gaggatcact tgagcctagg agtttgagac cagcctgggc       4920  
             agtatagtga gacccccatc ttaaagaaaa aaattaaaa atatatatat ataaaaaat       4980  
 60          tgagacctta atataatttc tgaggctgag gcgatggat cacttgagac caggagttca       5040

ES 2 797 679 T3

agaccagcct ggccaacatg gtgaaacccc atctgtacta aaaatacaaa aattagccag 5100  
 gcatggtggt gcacgcctgt aatcccagct actcaggagg ctgaggcagg agaatcactt 5160  
 5 gaaccacagga ggtggaggtt gtagtgagcc aagatcgagc cactacactc cagcctgggt 5220  
 ggcagaatga gactcactct caaaatatat atatatatag tttctgagtc ctttctgtct 5280  
 10 gcacatata ttagctcatt taagccacac agcagtcctg tgagctaggt gctatgatat 5340  
 tcccattttc cagatgagga aactgaagct cagagagtat aaactcttga cacacaacta 5400  
 aggagtggga gagctgagac ttgaaccacg gcgtgcctga ctccagagcc tgtgtttcta 5460  
 15 gcaggcctgt ttggccagct cctgcctctc cttggccacg tggttgggag ggttgcctcc 5520  
 tgggaagctct gcggtctcac tctattctcc tgtcccaggc tgtgctcctg gcggacatcc 5580  
 tccccacact cgtcatcaaa ttgttggtc ctcttgccct tcacctgctg ccctacaggt 5640  
 20 ctgggtgagg gtagtgggag gcagggtggg caggagctga gaaaggggag gctgggatgg 5700  
 ctgagatgct gagagtagag accgacctc ccctccctt cccttctcac ccctcagcc 5760  
 25 cccgggttct cgtcagtggg atttgtgctg ctggaagctt cgtcctggtt gccttttctc 5820  
 attctgtggg gaccagcctg tgtggtgagt gtgtggttct gtgtcagatg gggagccccg 5880  
 aggaaccaca tcagagcatt tgtgggaaga gtctccccag cctcccagag gaaagggatt 5940  
 30 cattctgtca cccttagaag cctgctaggg ctatcagcag taggcgatgg gagactggga 6000  
 caatttgag gggtaggcag tggaggagat gggagaaaat ggatgaatta gatggagatt 6060  
 35 gaggtgaaca aagtcaagac tctgtgatgg accaggcaca gtgactcatg cctataatcc 6120  
 cagcactttg gaaagccaag gcaggcagat cacctgaggt caggagtctg aaaccagcct 6180  
 ggccaacatg gagaacccc gtctctacca aaaatacaaa aattagctgg gtgtggtggc 6240  
 40 aggagcctgt aatcccagct actcgggagg ctgaggcagg agaatctctt gaacctggga 6300  
 ggcagaggtt gcagtgagcc gagatcacgc cactgtactc cagcctgggt gacagggcga 6360  
 gactccgtct ccaaaaagaa aagaaaagaa aaagactgat gaaggggag agacatcaag 6420  
 45 ggtgcatgtc tgcccctggt ctgataactg ggtggatgga ggtgccactc tccatgaagg 6480  
 gacacgcagg ggagtggggc tctgcttcag acctggaacc tggcctatgc atgggatcta 6540  
 50 ttggagcctc tatgagctga tactgaggag gccatggcca gacacattag aggcctgggc 6600  
 agtgtggcaa ggtgtggtgt gaccatcca gtgcttctc tccccccagg tgtggtcttc 6660  
 gctagcatct catcaggcct tggggaggtc accttctct ccctcactgc cttctacccc 6720  
 55 aggtaagcag gtggagcagg gagtgtgggg agaggctgtc ccatggctcag cctaggtcct 6780  
 cctgaatgtt cctgtgttct ccttcccagg gccgtgatct cctggtggtc ctgagggact 6840  
 60 gggggagctg ggctgctggg ggccctgtcc tacctgggcc tcaccaggc cggcctctcc 6900

65

ES 2 797 679 T3

cctcagcaga ccctgctgtc catgctgggt atccctgccc tgctgctggc caggtgagct 6960  
 gccctgagcc gggagggaga ggggtccaag gagagaaaac ttggccatgg ctgggtgtgg 7020  
 5 tggctcacgc ctgtaatccc agcactttgg gaggccaagg agggcagatc gcctaaggtc 7080  
 aggaaaccag cctggccaac atggtgaaac cccgtctcta ctaaaaatac aacaattagc 7140  
 10 caggtgtggt ggcgggtgcc tgtagtccca actactcagg aggctaaggc aggagaatcg 7200  
 cttgaacccc ggaggcagtg gtggcagtga gccgagatcg tgccattgca ctccagcccg 7260  
 ggcgacagag ttagactctg tctcaggaag aaaaaaaaaa aaagaaagaa aagaaaactt 7320  
 15 gattatgatt gcaatcttca agtccctacc ttgctgtgaa gggagggcga atctggactc 7380  
 tgatagcccc aggtgtgagt cctggagctg ccacttttta gctttgtagc gttgaacaag 7440  
 ttactccacc tctctgaacc ctcagtttcc ccatatctca aatggcagtt gttcttgctt 7500  
 20 tccttgaggg tgatgagggt aatgcattca gcacagtgtg gttcccaagg tgattagaag 7560  
 taggatgagg gtggacttta tttgattagt tccttttttt tttttttttt tttttaatca 7620  
 25 gtgttgacca ggttggcctc gaatgtgtag ccttgctgctc ctgagtgccca gggcaacagg 7680  
 cctgaaccat ggcgactccc tttttttttt tttttttttt ttttttttga gacggagtct 7740  
 catggtgtca ctcaggctgg agtgcagtga ctggtgtgat ctcagctcac tgcagcctcg 7800  
 30 gcctcccggg ctctagtgat tctcctgcct cagcctcccg agtagctggg actacaggcc 7860  
 catgccacca tgcctggcta attttttata ttttttagtag agacgggggtt tctactgtatt 7920  
 35 ggccaggctg gtctcaaact cctgacctca agtgatccac ctgccttggc ctcccataat 7980  
 gctaggaata caggcgtgag ccaccgcgcc cggcctgatt agttctgtgt attttcatgc 8040  
 atattacaaa acactttggc cgggcatggt ggctcacatc tgtaatccca gcactttggg 8100  
 40 aggccgaggc gggcgcacca cgaggtcagg agtttgagac cagcctggcc aatatggtga 8160  
 aaccccgtct ctactaaaaa tacaaaaatt agccaggctt ggtggcgctt gcctgtagtc 8220  
 ccagctactt gggaggctga ggagaagaat cgcttgaacc caggaggcag aggttgcagt 8280  
 45 gagccgtgat tgtgccactg cactccaggc tgggcaacag agcgagactc cgtctaaaaa 8340  
 aaaaaaaaaa acacactttg aactagccag acacacctgg cccttcacaa gattagtgtc 8400  
 50 taggacaagt ctaagtagaa aaagtgagtc catttaaaga aaaatattaa gtaaaaaat 8460  
 atatatacag gaggaatatg gatatggcaa ataacatgaa gccagaacct aagtgactaa 8520  
 aatcgaggaa gttctggcct agcacagagt gaacgtataa ttaatgggag ctagagcgac 8580  
 55 cattagaata ataatggcca gaaaacagaa ctgactcgct aggtatgagc cagcagtcgg 8640  
 aacaagggcc tgctgagcac agtggctcac agctgtaatc ccagtgtctt aggaggctga 8700  
 60 ggctggagga ccactagagg ctagaaatct gagaccagcc tgggcaacat agcgagactc 8760  
 catttataca aaaaatggaa aatatgaggc gggcttgggtg gcacgtgcct gtagtccccg 8820

65

ES 2 797 679 T3

ctacttggga ggctgaggcg ggaggattgc ttgagcctgg gaggtcgcgg ctgcagtgag 8880  
 ctatgattgc accactgcat tccagcctgg atgctggaga aagaccctgt ctctgaaaaa 8940  
 5 aatcaaaaca aatgaaggc ccatgaatag gaataaggag ataaattcag gtccaaagaa 9000  
 agaagccttt gtccacaatt ggagctctcc cgcacagcgt aggagcctta gaggcagtga 9060  
 10 gctaccatc tttgaaagt ttcaaaggta gaggtgttcc ctgggaaaag tggcctagat 9120  
 ggtccctggg gaccttccca gccagtaggg ttttctgacc ctgccttcat cctactccta 9180  
 gctatttctt gttgctcaca tctcctgagg cccaggaccc tggaggggaa gaagaagcag 9240  
 15 agagcgcagc ccggcagccc ctcataagaa ccgaggcccc ggagtcgaag ccaggtagga 9300  
 gacacagacc ctcaagaggg tcactttctt tctctctggg tttggccttt tcctctctgc 9360  
 aataggcaaa gttaagaggg gaaagagagt gagtgtactg gttatgggaa aagcctttgt 9420  
 20 ctatttgaga aatacttgtt gaggacgagc acagtggctc acgcctgtaa tatcccagca 9480  
 ctttgggagg ctgaggcagg aggaccactt gagctcagaa gtctgagtcc agcctgggca 9540  
 acagagcaag accttgtcgc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaaa agaaaggaag 9600  
 25 gaagggaggg agagaagaag ggatattaat tgagtactta ccatgtgcca ggcatccea 9660  
 tcacaagtgc tgaggccctg cgggtgggat aagctgggat gttctagaac cagagaatgg 9720  
 30 ccagtgagac tgggcagggt gggccaatgg ccatctgtgg agctgtacia gagacattgg 9780  
 ccgggcgtgg tggttcatac ctgtaatccc agcactttgg gaggctgagg cagatggatc 9840  
 atttgagatc aagagtttga gaccagtctg gccaacatgg taaaaccccg tctctactaa 9900  
 35 aaataaaaaa attagccagg tgtggtggtg catgcctgta gtcccagcta cttgggaagc 9960  
 tgaggcacga gaatcacttg aaccagagag gcagaggctg cagtgagctg agattgcacc 10020  
 40 actgcactgc agcctgggca actgagtgag actctgtctc aaaaaataaa aaaaattaaa 10080  
 aatcaaagag acgtgaagag gtctcacctg gttagctttt attttcatca tgataaagta 10140  
 tgtatattac ttgaagttta ccattttatt atttttatc ttactttatt tttttgaggt 10200  
 45 ggagtttcgc tcttgttgcc caggctggag tgcaatggcg caatctcagc tcaactaac 10260  
 ctctgcctcc tgggttcaag tgattctcct gcctcagcca cccgagtagc tgggactaca 10320  
 gacacctgcc accacacatg gctaattttt gtatttttag tagagatggg gtttctccat 10380  
 50 gttggccagg gtggtcttga actcctgacc tcaggtgatc cgcccacctc agtctcccaa 10440  
 ggtgctggga ttacaagcat gagccactgc gccagccat ttaaccatt ttaagtgtc 10500  
 caatccagtg gcatggaagt gagttcccac tgttgctggg tctggttaat tctgtcatac 10560  
 55 cgggtgcctct ttgccgagtc ttcagtgtga aaacttcate tgcccttctc tctctgttcc 10620  
 cctgcaggct ccagctccag cctctccctt cgggaaaggt ggacagtgtt caaggttcgg 10680  
 60  
 65

ES 2 797 679 T3

atgatggctg gggtatgtcc ctgtggggct tgctcacctc caggcccccc gcttatatct 10740  
 tctgcctttt ccagggtctg ctgtggtaca ttgttccctt ggtcgtagtt tactttgccg 10800  
 5 agtatttcat taaccagga cttgtaagtg aggggtgcta ggaggggtgt ggaggtggcg 10860  
 attggggctg ggaccacac agccccctc atctcccctg tctggtatth gttgcagttt 10920  
 10 gaactcctct ttttctggaa cacttccctg agtcacgctc agcaataccg ctggtaaagag 10980  
 gagcgagggc agtgggctgg gagggcgccg tggatgatgca gctgccctgc ccagtaggca 11040  
 ccggggggag cgggatggct cctggaggag cctcctctcc tcccccaac cetaacctca 11100  
 15 ggtaccagat gctgtaccag gctggcgtct ttgcctcccg ctcttctctc cgctgctgtc 11160  
 gcatccgttt cacctgggcc ctggccctgc tgcaggtacc aaaccctgc ccctcacttc 11220  
 actcccacct tggctcccag cttggctccc agcttccccca aaccctctgc ttcccactat 11280  
 20 cagtgggaag tgtaaatttt tttttttttt tttgagacag agtctogctc tgcctccag 11340  
 gctggagtgc agtagcgcaa tcttgctta ctgcaacctc tgcctcccgg gttcaagtga 11400  
 25 ctctcctgcc tcagtctcct gagtagctgg gattacaggc gcccgccacc atacctggct 11460  
 aatttttgta ttttagtag agatgggatt ttgccatatt ggctggtctt gaactcttga 11520  
 cctcaggtga tctgccggcc tcagcctccc aaagtgctgg gattacaggg aagtgtaaat 11580  
 30 tgtacactat catttcttag cacagggaac caaagtccag cagagctcca tgtaaaatgt 11640  
 atagcctcag gagccaagca aaactgagct tcagtactca gccactgtgt gacttagggc 11700  
 35 aggtctcaga acctctctga gcctcaattt cctcatgtat aaattgggtg tggccaatac 11760  
 ctatttttca ggtagttgt aagaaataga gatgagagaa agaatcgaag aacaagattt 11820  
 40 tgtagtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgctgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt 11880  
 gttttaagca ttgggattgg gccgggcccag gtggctcatg cctgtaatcc cagcactatg 11940  
 ggaggctgag gcaggtggat catttgagct tggtagttca agtccagcct gggcaacatg 12000  
 45 gcacaatcac atctctacaa aaattagcca ggtgcagtgg cgcacacctg tagtcttagc 12060  
 tactgggaag ctgaggtggg aggatcactt gaaccatga ggtcaaggct gcagtaacca 12120  
 aggtcatgcc actgcactcc agcctaggca atagagcgag accctgtctc ccagaaaaag 12180  
 50 aaaaaagaaa ggaaaagtcg gaaccttctt ctgtcgccta ggctggagta cagtggcatg 12240  
 atcataggtc atttacctca ggcaagaga caggctttca aataatgtht ctaactataa 12300  
 55 gaaaatgtac agttctttta ttctagatag ttaattataa tagaattggg gactttgaag 12360  
 tcagtgggtt atttatcttg aggtggtga gcaaattcaa ctgcccttgg caaacagtag 12420  
 60 tttacagctt taaggcgca aacaccttc cttacaacag tctaataaaa ggagtttcat 12480  
 ataaccagca ttcatgttt caaggttaca aatccacagc cctgcaggt aactgttaca 12540  
 ataaactgtc aactgtgaca ggaaagtctt ctgcctttga aatttaggaa ctggccagt 12600

65

ES 2 797 679 T3

cctggtggct cacacctgta atcccagcac tttgggaggc caaggcaggt gaatcacctg 12660  
 aggtcaggat caggagtttg agaccagtct ggccaacaca gtgaaacccc gtctctatta 12720  
 5 aaaatgcaaa aattagttgg gcgtggtggc acctgcctgt catctcagct actcgctagg 12780  
 ctgaggcagg agaattgctt gaactccgga tatggagggtt gcagtgagcc gagattgcag 12840  
 10 tactgtactc cagcctgggc cacagagcga gactccatct ccaaaaaaaaa agacttagga 12900  
 actcaattct gtgatagcaa aatacagaaa tagagattat actttaggct aggtgttgtg 12960  
 gctcacacct gtaatcccaa tgcttttggg ggctaggggtg ggaggatcac tcgaagccag 13020  
 15 gagcttgaga ccagactgga caacatagtg agacccccca cctctacaaa aaattaataaa 13080  
 aaaaaataag ccaggtggga gaattgcttg agcccagaag tttgagagag cagcctgggt 13140  
 20 aacatcacga gacctcatct ctacaaaaaaaa caacaacagg gtgtggtgac attcacctgt 13200  
 aatcccagct actcgggagg ctgaggcagg aggatcgctt tagcccagga gttccaggct 13260  
 gcagtgagcc ataatcatgc cactgtacc cagcctgggt gagaccctat ctcaaaaaaaaa 13320  
 25 aagattacac tttcatatta tggcaaaagc atgtaaatat cctccagcct ccttccttat 13380  
 ttatctgagc agtgctgcaa gcccaggggt tgtaccaca aaaccccaaa tttataactc 13440  
 30 agggtgcttg tagataccac tgaaacatgt agcttatggt ttaagctac atgtttttag 13500  
 ctataatggt ttttgttttg ttttgttttt tgagatggag tctcgctctg ttgcccaggc 13560  
 tggaatgtag cggtgcaatc ttggctcact gcaaccctg cctcccagat tcaagcgatt 13620  
 35 ctcaagcctc agccttccga gtagctggga ttacaggtgc gccaccacgc ccagcaaatt 13680  
 ttttgttttg ttttgttttg ttttgttttt tagagacaga gttttgctct tgtagctcag 13740  
 40 gctagagtac aatggcgtga tcttggctca ctgcaacctc cgcctcccag gttcaggcga 13800  
 ttcttctgcc tcagcctcct gcgtagctgg gattacaggc acgtgccacc acacctggct 13860  
 aatTTTTgta ttttttagta gagatgggggt ttcgccatgt tggccaggct ggtcttgaac 13920  
 45 tcctgacctc aggtgatcca cccgccttgg ccttccaaag tgctgggatt acaggtgtga 13980  
 gccaccacac ctggctagag gtgtgtcctt ttaaatgtc atctttaagt ctacctcaga 14040  
 50 ttaaatgaat taggacctct agggtaagcc ccgcttgggg catttgtacc tagatcccca 14100  
 ggcaattctt acatatacga aaagtatgaa ccgccacgag gaggcctaca cactgcacaa 14160  
 gaggcaatgt ggcgtggtca gtgctgggag gatggcacct ccttgagaga ctggggcaca 14220  
 55 gaggtgggac ctacaccctg ggggtgggat cgaagaggct tcctggccag gtgCGGTggc 14280  
 tcctgcctat aatcccagca ctttgggagg ctgaggcagg ggggcagcga ctgcttgaga 14340  
 60 ccaggagttc gagcccagct gaataggatg cccggctact cccacctgt tttaccatag 14400  
 tgaaccaacg gtttttcaa taggggcaat tttgctgccc agcggatgtt tggcaacgtc 14460

65

ES 2 797 679 T3

tgcaggcatg ctttggttgt cacaactgag ggatgctatg ggcacctagc gggcagaggc 14520  
 cagggatcct gctaaatgcg ctgccatata caggacagcc ctcacatgc agaacaacca 14580  
 5 gcaccaaacy ccaagagtgc tgcaattgag aaatcctggg ttcgatggtc cacttcctt 14640  
 taagaagcct ccattttttt tttttttttt tttttttttt ttatgagaca ggatcttgct 14700  
 10 ctgtcaccca ggctggagtg cagtggcaca atcatagctt actgcagcct ccacctccta 14760  
 ggttcaagca atcctcctgt ctcagactcc cgagtagctg ggactgcagg tgcgtgccac 14820  
 catgctcaac taatttttaa attttttgta gagacggagt tttgttatgt tgcccaggct 14880  
 15 ggtctcgaac tcctggcctc aagtgatcat cccaccttgg tctcccaatg tgctgggtatt 14940  
 acctgcatga gccactgcac caggctgagg ttgagaattt tttttttttt tttttgggat 15000  
 20 ggagtctctc tctggtgcc caggctggagt gcagtgtctc gatcttggct cactgcagcc 15060  
 tctgcctccc aggttcaagt gattctcctg cctcagcctt ccaagtagct gggactacag 15120  
 aaccactaca cccagataat ttttgtattt ttagttgaga tggggtttta ccatgtttag 15180  
 25 tagagaccag gccaggctgg tctcgaaatc ctgacctcag gtgatctgcc cacctcagcc 15240  
 tcccaaagt ctgggattac aggtgtgagc caccacaccg ggctgggtgt gagattttat 15300  
 ctagacctgg cagccctctc cttcaccagt aactcctaaa accagggacc cctggagggg 15360  
 30 aggccacctc tccttcctg ccccgccctg gtcccaggct tagcctctcc ccctgttcac 15420  
 agtgcctcaa cctggtgttc ctgctggcag acgtgtgggt cggctttctg ccaagcatct 15480  
 35 acctcgtctt cctgatcatt ctgtatgagg ggctcctggg aggcgcagcc tacgtgaaca 15540  
 ccttcacaaa catcgccctg gaggtcagca ttggccgggc aagggtggg ggtggcctgt 15600  
 40 ccagggacac ccagggcagg gatgtctggg actgaagcct caccctgct ctctgcctc 15660  
 ccagaccagt gatgagcacc gggagtgtgc aatggcggcc acctgcatct ctgacacact 15720  
 ggggatctcc ctgtcggggc tcctggcttt gcctctgcat gacttcctct gccagctctc 15780  
 45 ctgatactcg ggatcctcag gacgcaggtc acattcacct gtgggcagag ggacaggtca 15840  
 gacaccagc cccacccag agaccctcca tgaactgtgc tcccagcctt ccggcaggt 15900  
 ctgggagtag ggaagggtg aagcctgtt tcccttgca gggggccagc cattgtctcc 15960  
 50 cacttgggga gtttcttctt ggcatcatgc cttctgaata aatgccgatt ttatccatgg 16020  
 acttcttata tcgtttttgt ctctaaaaag aaacttttat tatgaaagta atacatgcc 16080  
 55 actttcctat atatagacag cataaagaag gtatgtcagc agatttctcc cttttttggt 16140  
 tgtttgttt tttgtttggt tgttttgaca gactctcact ctgtcaccta ggctggagtg 16200  
 caatggcgtg atcttggctc actgcaacct ccacttccc gttcaagcaa ttctcctgcc 16260  
 60 tcagcctccc gagtagctgg gattacaggt ggtcactacc atgtctggct aatttttata 16320  
 ttttagtac agacgacatt ttgccatgtt ggccaggctg gtctcaact catgacctca 16380  
 65

ES 2 797 679 T3

5 ggtgatccgc ccaccttggc ctcccaaagt gctgagatta caggtgtgag ccactgtacc 16440  
 tggcctctgc catctttgag gccttacgta ttcattcatt catgcattca ttgtttggga 16500  
 caatctgtaa acaatcatgt tggacattct ttccagcatg aaagttttca gagaagtgga 16560  
 aagaattgtg cagtgaatca tcctgagtat gcgccaccct gttctatggt aacattttgt 16620  
 10 tacagttggt ttatcatgta gtccagcccc catcaaatct atgtattcac tgttccatca 16680  
 gtgagtagat agagctaata atggcaggg ttggcacctg aggcatttta ttttattatt 16740  
 tttttttatt tttagagaca gggttgcaact ctgtcaccca ggctgaagta cagtggcaca 16800  
 15 gtcatggctc actgtagcct tgacctccta gactcaaaca atcctcacac cttggcctcc 16860  
 caagcagctg ggactgcaag tgcattgccac caagcccagc taattttttt tttttttttt 16920  
 20 gtagagacgc gatcttccta tgttaccag gctggtcttg aactcttgag ctcaagcagt 16980  
 cctgccttgg cctcccaaag tactgagatt acaagcatga g 17021  
 <210> 2  
 <211> 14881  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 2  
 30 tggacgtctg ctaagggacc ccgacaaggc ctagcttgaa taagtgggta cacttgtaga 60  
 ggcaggagat tgaaacccag gaaggactgg gctaggagtc tggctgactg taggaaaggg 120  
 agctcaggct tcaggagagg ctgtaagga gagaaaggt gagactacga ggaatggtgg 180  
 35 aagtttcggg tatctctctg cccctctcac cagtgtctcc ctcaaagcct gatgtagccc 240  
 aggagacga agccggagaa aatccatcct gcagggtctct gtgtgtccag aaagctcaca 300  
 40 atgaccatcc gtccccaccc acgaagtcct ccccagcacc caagacactt cctcttcccc 360  
 tgactctccc tgacaaatct ccaccccagg ccctgtgcac ctccccctg ctcatggatg 420  
 acttcatgac aggcaggggg atggcttaac agtgtccagg tgactcagac tggggtgcac 480  
 45 atctggaact aaagggcaga ggatcgggcc agaaagggga aagggaanaa aaaagtggaa 540  
 acaggagacc tcagaattgg gtatggggga gggggcattc ggcaagtgca gcctgagtga 600  
 50 ctcaggtctt gtattcgcac ctccagcatt tccgcctcct ccaagccaca gccttcagtg 660  
 agaggaagct agggtttggt gttcctgatt tatttggggg agaagctgta gaagtgagga 720  
 taaggccact ggaagttctg ggttcccatt ttcaacgcca ttaagatttt tctggggatg 780  
 55 aaaggtctgg attggtgctc aatgccaca ccctcaccta tggttattct tgtactgtgg 840  
 tcatgtgtcc tcacagctta ctgtgagttc cttaggaca gaggtgcag aatttctaga 900  
 60 gactcgtttg ggtaggagga tcctttttct cactgtttga gtgatctagg aagaacacca 960  
 caggagggca tatttcaaac ggcaaatctt aatgacaggt ggttgaaaag acccgggaga 1020

65

ES 2 797 679 T3

agtgggcaga ggctgctgga atccatagca gaggaatagg cttgatgaag aatggtcaag 1080  
 atgctgccct gccatcgagt ggaaggtaag ggaaggactc cttatttggga actgtgaggt 1140  
 5 gacacattcc aactatcctc tcagcctcat tctcctaact tccaattagg acaaacggct 1200  
 gacatcacag accaggaaaa acacccatag cagctttctc agtgaactta gcacctttgc 1260  
 10 tctatttctt actgctgagt ctctgaagtc agctaaaagt ctagcctctg ttgcacagtg 1320  
 gggcggaggg accttggttt tctcttgtaa aaccaggggt tggacaactt tcgtggtatt 1380  
 tgttgttcta ggatagtaag gcaaagggga ttttaaccgta acatcgtgaa tattgccaca 1440  
 15 gataattcat agaatgctgt tttgtgggtg tttatthtta atcgatctac tctcagctac 1500  
 ttcccagatg cttattatag gtctttacaa taggtctgta aggacaacag ataacacttg 1560  
 20 aggctggtcg cctttgcgct caagcagaac ttgtccttgg gacgttgggt ggggtagtgg 1620  
 gacatccgca gcaaagtagc cataattggt tcaggcaagt aagagctgca ggaaagaagc 1680  
 tgaagccttc cggccatga ctagtactgg cagatttgggt cggcgtctag agcgcctt 1740  
 25 ttcatggctc tacttgtggc tcccttcgac tccaattcaa aatcagtgct tccagcgttc 1800  
 tctcgaactc tccttctttt attctccgaa gtttgagaag tccaaaggcg aaaaagagaa 1860  
 aaaaggaccc ggaagtaaga agcaaccctc aagcacgtga tggagggtc acgggtactg 1920  
 30 tcacgtgacc cccaacctgc tcgtctacct tgcggagagt tcagctgctc ttaaaggtac 1980  
 aggcctgggg gcgggggctt tgctttagag gggcaggggg cggggtcagg cgggtggggc 2040  
 35 gtgggtgaac acgagctgga gatctgggga tccttcgacg gacatgtcgt gtatagcaga 2100  
 cagcggaaac tgggactgac cgcggggcat tgatccttcg caccacactg tcccagactt 2160  
 40 taatctgttt tcttgaagct agctcggaac acacgtgac tttgggacct ttgggggacc 2220  
 cgaactcaat gttatgggaa gttctgcggg ctctgaggag cgccttgagg attctgagag 2280  
 tgagtgtctt catcggttgc cttgggaatg accacctctg cccgcggctc tcccgaggag 2340  
 45 ttgggatgct ggccctgccc cctcaacacc atgcgggata ggccgggctt tcgtgtacct 2400  
 gagtgagtgg ggggtcatgc tttctctacc tcccagggga ggagaccgac tcagagcccc 2460  
 50 aggcccctcg gttggatagt cggagtgtcc tttggaagaa tgcagtgggt ttctggttaag 2520  
 tggctgaga gttgtgcaaa agtaaaatgc cagctgggag tgggtggcaca cgcctttaat 2580  
 cccagcattt gggaggcaga ggcaggcggg tttctgagtt cgaggccagc ctggtctaca 2640  
 55 gagtgagttc caggacagcc agggctacac agagaaacct tgtctcgaaa acaaaacaaa 2700  
 caaacaacaa aacaaagtaa agtgcgattg gagcaaagat gagagccaag ttgtgaaaag 2760  
 60 cagttgaata cacagatact taatcaactg tgaactttcc aagttccatt aaattcccac 2820  
 cttcacctat tgatcagatc ttagtatctg tagagttatt tattaatgt tttcctccag 2880

65

ES 2 797 679 T3

	ctaactttgt	tttttttcoct	cttccttcct	ttctttcttt	ctttctttct	tcctcttcct	2940
	cctcctcctc	ttcctcttct	ttttcttctt	ttttttggaa	aggtctttaa	accctacaag	3000
5	cagtaagggc	ttactttgac	ctttctaatac	ctgcttttgc	cttccaggtg	ctgcagttac	3060
	aggccctact	gtagcacaat	gcccagaaca	cccattgttt	ctgtttgacg	tgccaggtat	3120
10	taaaagcagg	tccttcccgg	gctcacgcac	tggtgtacaa	gtgagctctg	tctccagcca	3180
	atttgctttt	gccaagttct	gagcacagct	ctgggagatg	aaaataagaa	caatatgccc	3240
	tgctattatt	ttggttccct	tgagatcagc	aggtgaaaat	ttgtctccgt	tttgcacagg	3300
15	aatacgctag	atatttgcat	tgtaccacag	tgtttccggt	gatgagaaat	gcccagggat	3360
	cagaatctta	gtgtaagcgt	gggagaaata	gtgcttagga	ggacttggca	cttgcccatg	3420
20	agctgggtcta	atctcaaggc	ctgttttgat	agtggagaag	gaaaaaaaaa	aggtgtatct	3480
	ttaaggactg	taagtggata	gaaagccaga	cagtgaagat	gtgtcctcat	ttctaggatc	3540
	ttgggtcttt	gcaacaattt	ctcatatgtg	gtgatgctga	gcgctgcca	tgacatcctc	3600
25	aagcaggagc	aggcgtctgg	aaaccagagc	catgtaagta	agcccctott	caccaccacc	3660
	ataggtcagt	aagtgagccc	ctctgtacca	ctacatagg	tcagtccgca	tggggaatac	3720
30	taagaacca	ctcagggcca	gaggaccctt	gaaaaactcc	tagagtagct	ctgggtggga	3780
	ttggggagct	aaaggtctta	gtctcccaca	tcctcatggc	aggagggatc	ttaaagagag	3840
	caacgggtac	caggttggtg	aactcacata	actggctggg	taagacctta	ttttgtggtg	3900
35	tgttttgtca	ttgtaccctg	ttgacatttg	aggtcaggtg	actgttgtga	gtctgtcctg	3960
	catgttgtag	atgtttagta	gcatcccatt	ccccttgtca	accaaaagtg	acagccaaaa	4020
40	atgtctccag	atgttacaaa	tgctcctgcc	aggtaacatt	accaggtggg	agagcctttg	4080
	gcggcagtga	gctagagcac	gcaggcccta	agaggcgag	cctccacttt	gcaggttcac	4140
	taggaaattt	gaccaagct	gatattttcc	agaaaccag	atttctatat	gaatgctctt	4200
45	aaacatggtg	catccatctt	ggggggctgt	ctttggcctc	tggcccaaag	tttgagatgc	4260
	ttataaacac	tctcttcatt	gtggacattg	aaaaactaag	gccccctaga	agccttgcct	4320
50	accacagcc	atgtgtgaag	ttaggacaga	actggacctg	ggccttgggt	agcctcctgc	4380
	cgctttgtcg	gaaagaccct	cttctctccc	ataggtggaa	ccaggcccaa	caccacacc	4440
	ccacaacagc	tcactctgat	ttgactgcaa	ctccatctcc	acagctgtga	gtgtccatgt	4500
55	ggggacccca	cgatccttgc	ctttgcaatc	tcgtttcccc	acccccaccc	ccatccagtt	4560
	gggaatggtg	ggattgcagt	gatgaatata	aatatgtaa	tagtaattat	tagttcaggt	4620
60	gcccccttc	ccccagcttt	gtgagtga	caactgtaagt	ttccctcttt	ggatgaggaa	4680
	actgaaggtc	agagtgtata	aatatgccct	gacagccatt	tgaggagccc	cagagcaggg	4740
	aatgaatgga	gatctatcta	actccagagc	ctaacttaca	gcaggtctca	ctggccggct	4800
65							

ES 2 797 679 T3

	ccccggctgg gttgggaagg ttgtctccgg gaaggtctag gctctcactg tgttctcctg	4860
	tctcaggcgg tgctcctagc agacatcctt cccacccttg tcatcaaact cctggcgcct	4920
5	cttggccttc acttgctgcc ttacaggtct gggtcggggg ggcaggaggg aggcagggtg	4980
	ggaggaagcg ggagtctgga gagtctcgca tggaggtggc cttctgagtt cctcctcatc	5040
10	tcttctcagc ccccgggtgc tcgtcagtgg agtttgttct gctgggagct ttgttctggg	5100
	tgccttctct cagtcagtgg ggtaagcct gtgtggtgag tacgaagctg ggagagggtg	5160
	atggactcaa cagagtgatg tgctgtagtc tccccagctt cctgtgtgtg tgtgtgtgtg	5220
15	tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg agagagagag agagagagag agagagagac	5280
	acacacttgg gagattgtga atttgagatt agttggggcc acatagtga ttcaagccta	5340
20	tcctaagctg cacagcaaaa ccctatctca aaaaacaaag acaaaaaaaaa accaaaaaaaa	5400
	caaggagagg gccagtccag gctgatttac atagcaagtt ccaggccagc ctggactaca	5460
	tccccgagac tttgtctcaa agacaaacct cctagagctt ccctaaccag aagtgagctc	5520
25	taggaacaat tggaggggtg caataggaag gaatggggag actgagtata ggtggggatg	5580
	agcagggttg aataattggg aattattaac tgaatgaaga tgggggtaca gtctcggaga	5640
30	ggacatgtgg aggaggggtg ggcttttcag atgagaccct agcctgtctg ttcagtgaca	5700
	gatctgttct tagccctgct gagctgatgg agttgaggct gtaaacaac caccggggac	5760
	tgcggctttc agttaaaggt cactgtttgc tgtttgtcct cccaggagtg gttttggcca	5820
35	gcatctcctc agggctaggg gaggtcacct tcctctcact gactgccttc taccacaggt	5880
	aagcggcctg ggccaggagg actgggagac gagtgcccc tgctggcttc catcttcctc	5940
40	agtgtctctg tcttcttttc agtgtctgta tctcatggtg gtcttcgggt accgggggtg	6000
	cagggttct tggatcgctg tcttacctgg gactcaccca ggctggcctc tccccgcagc	6060
	acaccctact ttctatggtg gggatccctg ttctgctgct agccagggtga gtgtccttag	6120
45	gcccaaagga tgaagatgg aaggaggagc ttgatgctaa tccaatcttc agagctcttc	6180
	agccttggtg tgaaggggtg tggactctgg actctcgaca cccctcaggt ggaatctcag	6240
50	agtggggctg tgtagctgt gcgactctgg acaacttcat tcctgacctt cagttgtctc	6300
	tgtctcaggc tggttctgtc tcatccgcac aggtcggctc ctgagactgg ggctgggact	6360
	gagtgcaccc cggtttattt cttctgtgtg tatttgtata ttttagaaaa cattattaag	6420
55	ccagggtgtag tggtagatgc ctttcatccc agcaactctg aggcacatg ttatagctta	6480
	gggctattgt ggggtatcca ccagaaagac ggctcagaca tgggtttaa cccagtggaa	6540
60	agccgattag tcacctggtg actacacact gcactgttcag tggcatttcc attggagtca	6600
	gttgtcctaa ggtccgggtg cctgttacia ggctatcttg aagaaaagga gtcagtatgt	6660

65

ES 2 797 679 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

gtgtaatgct gaacacccac agtcctggct cttgggaggt gatggaaaag gctcatgtgt 6720  
 ttgaagccta cctgggatac acgtggagac cctggctcaa aagctaactg agataattga 6780  
 acatatggca aatgcctcta atccaagccc tcaggaggca ggaggatctc tgtgagtttg 6840  
 gggtcagcct ggtctacatc ttgagctcca ggccagccag agctgcatag ttaagaccct 6900  
 gtctcaaaaa aaaaaaaaaa gaaagaaaga aataaagcaa tcccatgatc atacagaccc 6960  
 tgggtaaact cagtcacaac acgaaacaaa aagacactga gtatgagaaa gggacctgtg 7020  
 atgtgggaaa ggtcacaggg tgtggggacc cgaggggggtg gggagagtca ccagagggca 7080  
 gtatatatgt gaataaaaat gtcaagaaac acatttagta agaatctctg tgaagtgggtg 7140  
 aatagatgag aagtactgag aacagggaaa cgagcaggtg ctgtgactga gtcaaatgag 7200  
 gtccctgggt agaaacaaag aagcttttcc agcacaggtt acctagaggc tgggagcacc 7260  
 ccatgcaagt gtgaagggcc tggaggggcg ggccctgcagg acctctgggg cctttcccga 7320  
 caagagcccc ctgactcgct tctccattcc atcccagcta tttcttggtg ctcacgtctc 7380  
 ctgaaccctt ggaccctgga ggggaaaacg aggcagagac tgctgcccgg cagcctctca 7440  
 taggcaccga gaccccagag tcaaagccag gtaggatgca aaggccctcc catcccaggg 7500  
 ccactttccg ccttgggggtt ttggtctcaa cagtggacac agttgagggg aacaggctgc 7560  
 taggtgtaca ggtctgggtc aaagcagtca tgtatactta ctaactactg actggatgcc 7620  
 agacattccg attgctggga atggtagtgc tccagatgaa ggaatgagag cattttcaca 7680  
 ggacataaaa ctgctgatgg gccagaggg gtggcgacaca ccttgaatcc caacactccg 7740  
 gaggcagcca caatcagatc tctatgattt caaggccggt tgggctacat agtaagaccc 7800  
 tgcacagacc cagaaagtaa cggttaagga aatgggggtg ggatggctaa gggagctgct 7860  
 ttacaggagg ttccaagtgt gggggttttg ttggtgtttt gttttttctt caagtttttg 7920  
 cttattgggt tttaaatagt ctctctgtat agccctagct ggcctagaaa tcaactgtga 7980  
 ctctcgaatg gcctcaacct cacaaatcca cctgcctctg cctctcaaat gctaggagta 8040  
 aacgcatatg ccaccataca cctggctaggt atttattttt ctattttattg atgtgtatgt 8100  
 gtattttgtga acttataacc cggatgacca gcagagggca tcagatgcct tggagttgca 8160  
 gttacaggca gttgggagct ggccgatggt gccaggattc aaacgtggac cccctcatgg 8220  
 ttgagcaacc agtgctcgct cgctctttct ttccctttct ctctttcttt ctttctttct 8280  
 ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt ctttctttct ttctttcttt ctttcttctt 8340  
 tccttccttc cttcctttct ttctttcttt ctttccgatt tattttattta tttaatgtat 8400  
 atgagcacia tgtagttgtc ttcagacaca ccagaagagg gcaagagggc atcagatctc 8460  
 ataacagatg gttgtgagcc accatgtggt tgctgggaat tgaactcagg acctctggaa 8520  
 gagcagtcag tgctcttaac cactgagcca tctctccagc ccctctttct ttttttttta 8580

ES 2 797 679 T3

ttgtttgttt gttttgttt tgtttgttt tttgttttt tgttgttggt gttgaggcag 8640  
 agcttctctg tgtagctctg gctgtcctgg aactcactct ctagaccaga agtcaaaaat 8700  
 5 tctcctgcct ctgctttcca tgcgctggga ttcagggcgt gtgccgccac ttaaccccaa 8760  
 gccacctctc caactctgag aaaggctcta cttatttatt taattttgta attatttggt 8820  
 10 tgtttgtttg cttgcttttc gaggaagggt ttctctgtgt agccctggct gtcctggaac 8880  
 tcacactgta tgtaatccag gctgccctca aactttcaga gatccacctg cctcagcctc 8940  
 ccaagtgggg attaaaggca tgcgccacca ctgccagcg atttgtctat ttttatttta 9000  
 15 tgtgcattgg tgttttgctt gtgtgcatgt ctatgggagg gtgttgatc ccctggaact 9060  
 ggagttacag acagttgtga gctgccacgt ggggtgctggg aattgaggtc cgctggaaga 9120  
 20 gcagccatta ctcttaacca ctgagccatc tcttgagccc ccgagagaac cccaacaac 9180  
 aaacctttta tttttgagaa tggagctgtc tgggcaagag cgtgtgcaca agtgtgaggt 9240  
 ctgacgttct gaggattgag ctctgctcat tcagactcgg cagtgagtgc cctcatccac 9300  
 25 cgagcatcca tcagcccaag acagcctttt gaaggatatc tctgggctga aacttgctg 9360  
 tcaagtgctc agctttgcaa atgcctaggt gatcatgttc caggcacagg aaacagctca 9420  
 30 gggtgaggcc ttatgtgaga aaaggagcct ggttgttcta gaaatgaaag gcttagccag 9480  
 agtctgggat ggagtcggta gataaaagct gtaccctgat ctatagtctt gctcattaa 9540  
 aaaaaaaaaa aaaagtttta taagtatatg tgtgtatata catatgtata cagcgcgaag 9600  
 35 tttaccattt tagcgactac taagtgtgca ctaagtggca tttaaatcca cacactgctg 9660  
 tgctggctgg ttgcttgctg catgctggca ccttagctaa gcgttcagcg tgcaacctcc 9720  
 40 tccccttccc cctgctctgt aggtgccagc tgggacctct ccctccagga aaggtggaca 9780  
 gtgttcaagg tttgaatggt ggctgcgggt gccccgtgag gatcctctgc ctcttgctt 9840  
 ccacttacat ctcccgactc ttccagggtc tcttgtggta catcatccct ctggtgctgg 9900  
 45 tctactttgc agaatacttt atcaaccagg gacttgtgag tgaggggagc cggggaggga 9960  
 tgtgggagga gagatagggc tgaggttccg ccatctccat ctgtctggtc ttcgctgcag 10020  
 50 ttcgagctcc tgtttttccg gaacacttcc ctaagccatg ctcagcagta ccgatggtga 10080  
 gagaagtgg cagggtggca gtaggctggg aggatccctg atggtggggg cctgggggtg 10140  
 acccaaaaaa gtgccctgag agcctcttcc tcttctctgc cccaacctta ggtaccagat 10200  
 55 gctataccag gctggtgtgt tcgctcccg ctcttctctc caatggtgcc gaatacggtt 10260  
 cacctgggtc ctagccctgc tccaggfact gagtgctgcc ctgtttggtc acaccacct 10320  
 60 cggcctcctg agtttcttac attagtgtac tccagcgttc ctaagtacag cactaaaggc 10380  
 cagctggact ccatataaaa tgtgtgggtg caccaggagg aaccagtcac acttgtgggt 10440

65

ES 2 797 679 T3

aaattccagt ttctgttctc aagagctgtg tgactcagag cagtctctga acctctattg 10500  
 agcctcagtt ttcctatcag gaagtcagat ggggtggagc aggattgtgc acctagcctg 10560  
 5 tctgaggctg tgggtcccat ccctagtact gcaaaaatta aaatatttaa tagctgtggg 10620  
 caacacctat ttctcagtggt ttgtatagca atgttgagaa aaaaaaggaa gaacaagata 10680  
 10 ttgttttgat ttattttgggt tttgttcttg tctgctttat ttttttttct ttgtttgttt 10740  
 ttaaggtagg gtctcactgt gtagtcctgg gtggcctgga atccgatatg tagactaggc 10800  
 tagcctgaag ctcacagatc tgcttcatga atgcgggctg tgagggcctg tgcctcgtgc 10860  
 15 ctggccgtcg tgctttgttc tcacagtcgt tctgactgca cctggggcct tgttcctgct 10920  
 ggtccatgct gattgttaog aaacttctta agccctcaag cttgctttca tttacttact 10980  
 tatttacttt aaagatttgt ttgtttatat ataaacaaac tgtagctgtg ttcagacaca 11040  
 20 ccagaagagg gcatcagcta gccgggctg gtggcgacg cctttaatcc cagcactcgg 11100  
 gaggcagagg caggcggatt tctgagttcg aggccagcct ggtctgaaaa gtgagctcca 11160  
 25 ggacagccag ggctacacag agaaaccctg tctcgaacc cccccaaaa aaaaaaaca 11220  
 aaaaaaaca aaaaaaaaa acagaagagg gcatcagatc ccatcataga tggttgtgag 11280  
 ccaccatgtg gttgctggga atcgaactca ggacctctgg cagagcagtc agtgctctta 11340  
 30 accgctgagc catcgtctta gccctattta tttattttat acaatttaa taaacacact 11400  
 tatatttata tttatttatt ggtgggaggg agacacttgc caagccgtgt gtatggaggt 11460  
 35 cagaggacag cgtgcaggat tggttccctt cttcaacgtg tgggttctgg tgatcaaaact 11520  
 caggtcatac aggcaagtac ctgtagctga gccatctctt cagcccaaac agggtttctc 11580  
 tgtatagccc tggctgtcct ggaactcact ctgtggacca ggctggcctc gaactcagaa 11640  
 40 atctgcctgc ctctgcctcc caagtctgg gtttaaaggc gtgcgccacc actgcccagc 11700  
 tcagcccaaa ctttttattt ggaggcaaag tcttcaaagc tggccttgaa cctacatctg 11760  
 aggccacat aagccttgac cattgtttag tttatatata cacaacctt tgtctatgtg 11820  
 45 tatatatgtg aaccacctgt gtgcctgggtg cccatggagg ccagagaggg tatcagatcc 11880  
 ctggaactgg aactacagat aggtgtggac cgccctgtgg gtgctgtgga agaacagcgg 11940  
 50 gtgcctttaa ctactgagcc atctttccag tccaaaattt tgtactcttg acatttgagc 12000  
 ctagatcatt ctgatgtgtt acttgctgta ggtgtttagc agtatcccta gctgggtgaga 12060  
 cggcaagtag gtctccagac attgtcaaat gaccattga tttcagtga gtaattaggg 12120  
 55 gagaacaggt gatgttcagg gggccttgg gtgctgagga taggactctg gtagagcatt 12180  
 tgcctctgaa tcacaagctc tcgtgttagc tctgcagtg atgtgtgtgt gtgtgtgtgt 12240  
 60 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtttgt gtgtgtgata cacatggtag ggggtgtctag 12300  
 gtgttaggat tcatgccatt aaaaaagaaa caaaaaggca agaaggagag gaggtgactg 12360

65

ES 2 797 679 T3

atgaccacag tggaatgacc ctggtccaac tgagagctca ccagtgatgg gaagttgagg 12420  
 aacattacag gctaagagtg acagggacaa gtcaaggaag gggagaaacc cacaaggcat 12480  
 5 gtgaggatga ggatggggtc atcgagggcc taccaagatg tgggggtccc acaggcccag 12540  
 ctgggcactg ggaccctaca cagccctctg cttcagcggc atctcctata acctggcagc 12600  
 10 tctgagacct gctgcctccc tgccgtattg ttgccagtc tcacgcctcc cttccctctg 12660  
 cccacagtgc ctcaacctgg ccctcctgct ggagatgtc tgcttgaact tcttgcccag 12720  
 catctacctc atcttcatca tcattctgta cgaagggtc ctgggtgggg ccgcttacgt 12780  
 15 gaataccttc cacaacattg ctctggaggt ctgtgccagt tggacaaggg ctgtgggtgg 12840  
 ccttaggagc cttgtggatg gaagccctaa ccctgttct ttgctctccc agaccagtga 12900  
 20 caagcaccga gagtttgcca tggaagctgc ctgtatctct gacaccttgg gaatctccct 12960  
 gtcgggggtc ctggccctgc ctctgcatga cttcctctgt cacctccctt gacaggagtt 13020  
 gctcgacaca cactgatctg caggcacatg agcagatcac acatcttoga gctctgccac 13080  
 25 agcctttccc tgcccactg cagcaaggag ccctgatgt tcccactcc tgagctggcc 13140  
 tcagagtttt ctctaccct ctgcccttct aataaatgct tattttaaca gtttcctttt 13200  
 30 tgtgcagtct ctgaaacgga aagtttcat aagcccactg tgaagatat atgtatttat 13260  
 gaatgtataa agtatttcag acaaggtgtg gcacacacct gtaattccag cactcagcag 13320  
 actggagaat ccaagttcac gtctgactgg gatatacggg gagaccctga ggactagggc 13380  
 35 tatagttcag tggtagagta cttgcccagg atgtcctggg ctctcagttt tatccctgga 13440  
 aaacaattca aaagcagcgt atgctaatat aagcctgtag tcccaggatt ggggaggtag 13500  
 40 agacaggagg atccagagtt catggtcctc agctacatag gaaaccaagg tcagcctggc 13560  
 ctacataaga tcttgtttta caataattac attgtgtatt tctggcttct ttataaaaa 13620  
 45 aatcaaatg tccataggtg tgtagattta tatctgggtc ttcgattcca ttgatcaact 13680  
 tgtctgtttt tatgccaata ctgtgtgggt tttattacta taactctgta gtagtgcttg 13740  
 aaataaggat ggtgatacct ccaggagttc tattactgta cagagttggt ttagcaatcc 13800  
 50 tgtgtttcct gtttttttca tatgaaattg agtattgttc tttcaaggtc tataaagaat 13860  
 tgtgttgga ttttgatgga caactgattt ctttcttcaa tgtcttaaag tttttatcat 13920  
 ataactctt gacttgcttg gttagattga ccctacaata ttcatagaag acgaagtggg 13980  
 55 tagtagccct gaacgaatgt cacaggagac aacttctga acagaacacc aatagttcag 14040  
 gcactaaaat tgacaataaa ccagatctca tgaaactgaa aagcttttgt gaggcaaatg 14100  
 60 atattgtcat ctggcagcct acagaataga aaaagatttc taccaactca atatctgata 14160  
 gaaggcta atccgtaata tataaagaac tcaaagccgg gcggtgggtg cgcacgcctt 14220

65

ES 2 797 679 T3

	taatcctagc actcaggagg cagaggcagg tggatttctg agttcaaggc cagcctggtc	14280
	tacaaagtga gttccaggac agccagagct acacagagaa accctgtctc gaaaaaaaa	14340
5	caaagaacaa aaaacacgag ggagagagaa agagaaagag aactcaagaa gctagacatc	14400
	aataaggcaa atagcccaa taaaaaatgg ggtacagagc tgaacagaga cttctcaaca	14460
10	ggaatctcaa atggctgaga aacacttaga acttcatcat ccttatccag cagggaaatg	14520
	caaatcaaaa ccaactctgag attccatctt taacacctgt caggatggct aagatcaaaa	14580
	ctcaagtaac agctcatgct ggcgaggatg tggagaaagg ggagcacttg ggagcaaggg	14640
15	gagcactctt cggttggttg tgagaatgca aatttgtaca gccactttgg agatcaatat	14700
	ggtagtttct tagaaaattg gaacctccag acccagctat accacttctg gggatatacc	14760
20	caaaggatgt cccatcctac cacagggaca cttgctcaat tatgttcaca gcagctttat	14820
	ttataataac cagaaactgg aaacaacctc gatgtccctt aactaaggaa tggataagaa	14880
	a	14881
25	<210> 3 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
35	<400> 3 acacagaacc acacactcac cacac 25	
40	<210> 4 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<400> 4 gagaagagat gaggagga 18	
50	<210> 5 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
55	<400> 5 ggctgagaag agatgagg 18	
60	<210> 6 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Oligonucleótido sintético	

<400> 6  
 gggctgagaa gagatgag 18

5 <210> 7  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 7  
 cactgacgag cacccggg 18

15 <210> 8  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 8  
 ccactgacga gcacccgg 18

25 <210> 9  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 9  
 tccactgacg agcacccg 18

35 <210> 10  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 10  
 aaactccact gacgagca 18

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 11  
 gaacaaactc cactgacg 18

60 <210> 12  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 12  
 agcagaacaa actccact 18

5 <210> 13  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 13  
 tcccagcaga acaaactc 18

15 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 14  
 aagctcccag cagaacaa 18

25 <210> 15  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 15  
 aacaaagctc ccagcaga 18

35 <210> 16  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 16  
 ccagaacaaa gctcccag 18

<210> 17  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 17  
 gcaaccagaa caaagctc 18

60 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 18  
 gaaggcaacc agaacaaa 18

5 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 19  
 gagagaaggc aaccagaa 18

15 <210> 20  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 20  
 gactgagaga aggcaacc 18

25 <210> 21  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 21  
 cactgactga gagaagc 18

35 <210> 22  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 22  
 acccactga ctgagaga 18

<210> 23  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 23  
 ctaacccca ctgactga 18

<210> 24  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 24  
 caggctaac cccactga 18

5 <210> 25  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 25  
 cacacaggct taacccca 18

15 <210> 26  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 26  
 tcaccacaca ggcttaac 18

25 <210> 27  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 27  
 gtactacca cacaggct 18

35 <210> 28  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 28  
 cttcgactc accacaca 18

<210> 29  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 29  
 ccagcttctg actcacca 18

<210> 30  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 30  
 tctcccagct tcgtactc 18

5 <210> 31  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 31  
 gggatggaat ggagaagc 18

15 <210> 32  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 32  
 agctgggatg gaatggag 18

25 <210> 33  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 33  
 aaatagctgg gatggaat 18

35 <210> 34  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 34  
 caagaaatag ctgggatg 18

<210> 35  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 35  
 gcaacaagaa atagctgg 18

60 <210> 36  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 36  
 gtgagcaaca agaaatag 18

5 <210> 37  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 37  
 agacgtgagc aacaagaa 18

15 <210> 38  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 38  
 caggagacgt gagcaaca 18

25 <210> 39  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 39  
 gggtcaggag acgtgagc 18

35 <210> 40  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 40  
 ggggtcagga gacgtgag 18

<210> 41  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 41  
 ccctccagg gtccagg 18

<210> 42  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 42  
 tttcccctcc aggtcca 18

5 <210> 43  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 43  
 tcgtttccc ctccagg 18

15 <210> 44  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 44  
 tgctctgttt tcccctcc 18

25 <210> 45  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 45  
 tctctgctc gtttccc 18

35 <210> 46  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 46  
 gcagtctcg cctcgttt 18

<210> 47  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 47  
 ggcagcagtc tctgcctc 18

<210> 48  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 48  
 gccgggcagc agtctctg 18  
  
 5 <210> 49  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 49  
 ggctgccggg cagcagtc 18  
  
 15 <210> 50  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 50  
 gagaggctgc cgggcagc 18  
 25  
 <210> 51  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 51  
 ctatgagagg ctgccggg 18  
 35  
 <210> 52  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 45 <400> 52  
 gtcctatga gaggctgc 18  
  
 <210> 53  
 <211> 18  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55  
 <400> 53  
 ctcggtgcct atgagagg 18  
  
 <210> 54  
 60 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 54  
 gggctcggg gcctatga 18

5 <210> 55  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 55  
 cctggcttg actctggg 18

15 <210> 56  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 56  
 cctacctggc ttgactc 18

25 <210> 57  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 57  
 gcatcctacc tggcttg 18

35 <210> 58  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 58  
 cttgcatcc tacctggc 18

<210> 59  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 59  
 gggccttgc atcctacc 18

60 <210> 60  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 60  
 gggagggcct ttgcatcc 18  
  
 5 <210> 61  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 61  
 agctgatcat attctacc 18  
  
 15 <210> 62  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 62  
 agctgatcat attctacctg gtgct 25  
 25  
 <210> 63  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 63  
 aaaggcaacc aggacgaa 18  
 35  
 <210> 64  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 64  
 aaatgctctg atgtggtt 18  
 45  
 <210> 65  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético  
 55  
 <400> 65  
 acaaatccca ctgacgag 18  
  
 <210> 66  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 66  
 acaggctggt cccacag 18

5 <210> 67  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 67  
 accacacagg ctgtccc 18

15 <210> 68  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 68  
 actctcagca tctcagcc 18

25 <210> 69  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 69  
 aggacgaagc ttccagca 18

35 <210> 70  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 70  
 caaccaggac gaagcttc 18

<210> 71  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 71  
 cactcaccac acaggctg 18

60 <210> 72  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 72  
 cagaaccaca cactcacc 18

5 <210> 73  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 73  
 cagaatgaga aaaggcaa 18

15 <210> 74  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 74  
 ccacacactc accacaca 18

25 <210> 75  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 75  
 ccatctgaca cagaacca 18

35 <210> 76  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 76  
 cccacaaatg ctctgatg 18

<210> 77  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 77  
 ccccacagaa tgagaaaa 18

60 <210> 78  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 78  
 ctctgatgtg gttcctcg 18

5 <210> 79  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 79  
 ctggtcccca cagaatga 18

15 <210> 80  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 80  
 gaagcttcca gcagcaca 18

25 <210> 81  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 81  
 gcagcacaaa tcccactg 18

35 <210> 82  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 82  
 gctccccatc tgacacag 18

<210> 83  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 83  
 ggaaggtcgg ttctact 18

60 <210> 84  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 84  
ggtgagaagg gaagggag 18

5 <210> 85  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 85  
gtcggctct actctcag 18

15 <210> 86  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 86  
tcccactgac gagaaccc 18

25 <210> 87  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 87  
tctctactct cagcatct 18

35 <210> 88  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 88  
tgacacagaa ccacacac 18

<210> 89  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 89  
tgagaaaagg caaccagg 18

60 <210> 90  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Oligonucleótido sintético

<400> 90  
 ttccagcagc acaaatcc 18

5 <210> 91  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 91  
 ggaaggtcc ccaggac 18

15 <210> 92  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 92  
 tggtggaa ggtccca 18

25 <210> 93  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 93  
 cctactggct ggaaggt 18

35 <210> 94  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 94  
 aaaaccctac tggtggg 18

<210> 95  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 95  
 gtcagaaaac cctactgg 18

<210> 96  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 96  
 gcagggtcag aaaacacct 18

5 <210> 97  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 97  
 tgaaggcagg gtcagaaa 18

15 <210> 98  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 98  
 taggatgaag gcagggtc 18

25 <210> 99  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 99  
 aggagtagga tgaaggca 18

35 <210> 100  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 100  
 tagctaggag taggatga 18

<210> 101  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 101  
 agaaatagct aggagtag 18

60 <210> 102  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 102  
 caacaagaaa tagctagg 18

5 <210> 103  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 103  
 gagatgtgag caacaaga 18

15 <210> 104  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 104  
 ctcaggagat gtgagcaa 18

25 <210> 105  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 105  
 tgggcctcag gagatgtg 18

35 <210> 106  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 106  
 ggtcctgggc ctcaggag 18

<210> 107  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 107  
 tccagggtcc tgggcctc 18

<210> 108  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 108  
 tcccctccag ggtcctgg 18

5 <210> 109  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 109  
 ctcttcccc tccagggt 18

15 <210> 110  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 110  
 tgcttctct tcccctcc 18

25 <210> 111  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 111  
 ctctctgctt ctcttcc 18

35 <210> 112  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 112  
 ctgctctc tgcttctt 18

<210> 113  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 113  
 ccgggctgcg ctctctgc 18

60 <210> 114  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 114  
 ggctgccggg ctgcgctc 18

5 <210> 115  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 115  
 gggcctcggg tcttatga 18

15 <210> 116  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 116  
 cctacctggc ttcgactc 18

25 <210> 117  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 117  
 tgtctctac ctggcttc 18

35 <210> 118  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 118  
 gtctgtgtct cctacctg 18

<210> 119  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 119  
 tgagggtctg tgtctcct 18

60 <210> 120  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 120  
 ctctctgagg gtctgtgt 18

5 <210> 121  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 121  
 gtgacctctc tgagggtc 18

15 <210> 122  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 122  
 agaaagtgc ctctctga 18

25 <210> 123  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 123  
 gagaaagaaa gtgacctc 18

35 <210> 124  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 124  
 ccagagagaa agaaagtg 18

<210> 125  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 125  
 caaacccaga gagaaaga 18

60 <210> 126  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

# ES 2 797 679 T3

<400> 126

aaggccaac ccagagag 18

5

<210> 127

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 127

aggaaaaggc caaaccca 18

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consta de 8 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobase que comprende una región complementaria, en donde la región complementaria comprende al menos 8 nucleobases contiguas y es 100% complementaria a una porción de igual longitud de una región diana de una transcripción CLN3, en la que:
- 10 (i) la secuencia de nucleobase del oligonucleótido es al menos 90% complementaria a una región de igual longitud del transcrito de CLN3, medida a lo largo de toda la longitud del oligonucleótido; y  
 (ii) el oligonucleótido modificado no comprende más de 4 2'-desoxinucleósidos contiguos no modificados; y
- 15 en donde el compuesto es capaz de inducir la omisión de uno o más exones de la transcripción de CLN3, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Batten o para retrasar o prevenir la aparición de la enfermedad de Batten.
- 20 **2.** El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región diana de la transcripción de CLN3 comprende al menos una porción del exón 6, exón 9, intrón 5, intrón 6, intrón 9 o intrón 10 de la transcripción de CLN3, y en donde opcionalmente, el compuesto es capaz de prevenir el desplazamiento del marco que da como resultado un codón de parada prematuro en el exón 9 de la transcripción de CLN3.
- 25 **3.** El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la región complementaria del oligonucleótido modificado comprende al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, o al menos 20 nucleobases contiguas.
- 30 **4.** El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia de nucleobase del oligonucleótido es 100% complementaria a una región de igual longitud del transcrito de CLN3, medida a lo largo de toda la longitud del oligonucleótido.
- 35 **5.** El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el oligonucleótido modificado comprende al menos un nucleósido modificado.
- 6.** El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que al menos un nucleósido modificado comprende un resto de azúcar modificado.
- 40 **7.** El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que al menos un resto de azúcar modificado es un resto de azúcar sustituido en 2'.
- 8.** El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el sustituyente 2' de al menos un resto de azúcar sustituido con 2' se selecciona entre: 2'-OMe, 2'-F y 2'-MOE.
- 45 **9.** El compuesto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el oligonucleótido modificado comprende al menos 5 nucleósidos modificados, al menos 10 nucleósidos modificados o al menos 15 nucleósidos modificados, cada uno de los cuales comprende independientemente un resto de azúcar modificado.
- 10.** El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que cada nucleósido del oligonucleótido modificado es un nucleósido modificado, cada uno de los cuales comprende independientemente un resto de azúcar modificado.
- 50 **11.** El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que cada resto de azúcar modificado es un 2'-MOE.
- 12.** Una composición farmacéutica que comprende un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consta de 8 a 30 nucleósidos unidos y que tiene una secuencia de nucleobase que comprende una región complementaria, en donde la región complementaria comprende al menos 8 nucleobases contiguas y es 100% complementaria a una porción de igual longitud de una región diana de una transcripción CLN3, en la que:
- 55 (i) la secuencia de nucleobase del oligonucleótido es al menos 90% complementaria a una región de igual longitud del transcrito de CLN3, medida a lo largo de toda la longitud del oligonucleótido; y  
 (ii) el oligonucleótido modificado no comprende más de 4 2' desoxinucleósidos contiguos no modificados; y
- 60 en donde el compuesto es capaz de inducir la omisión de uno o más exones de la transcripción de CLN3, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de la enfermedad de Batten o para retrasar o prevenir la aparición de la enfermedad de Batten.
- 65 **13.** La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la composición comprende una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto.

**14.** La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de sodio o potasio.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

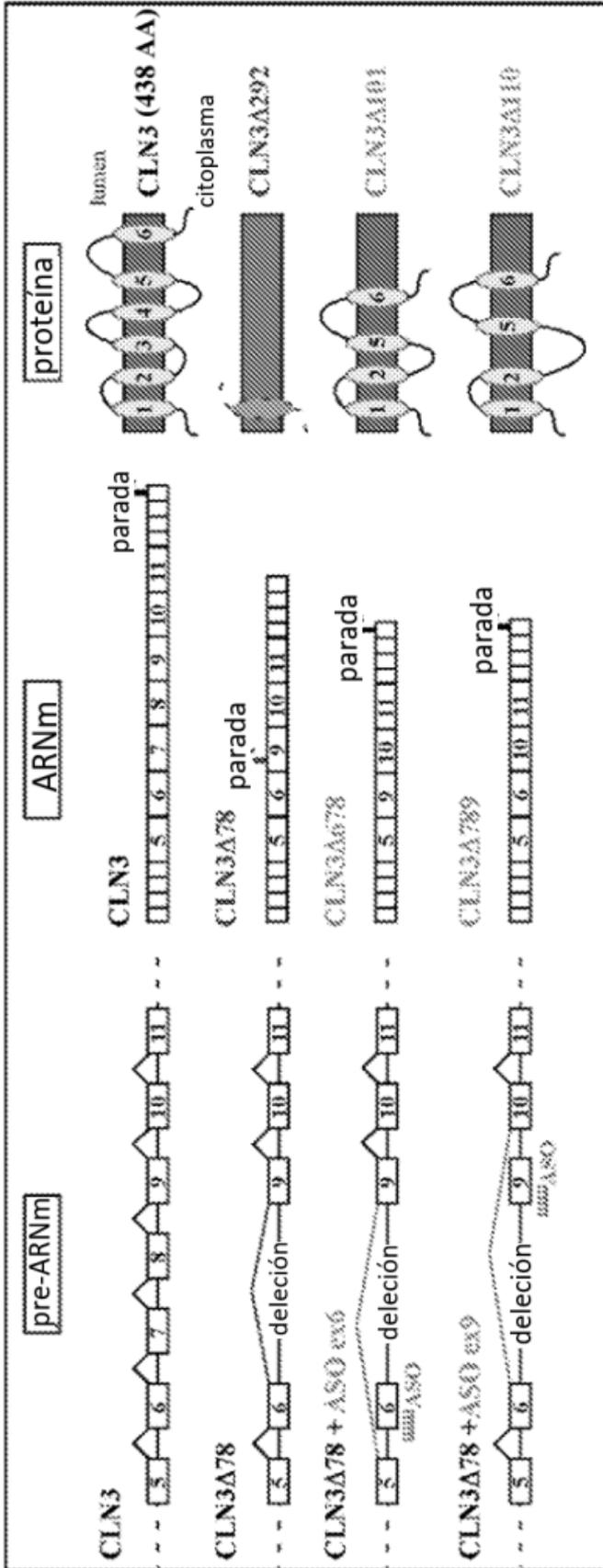


Figura 1

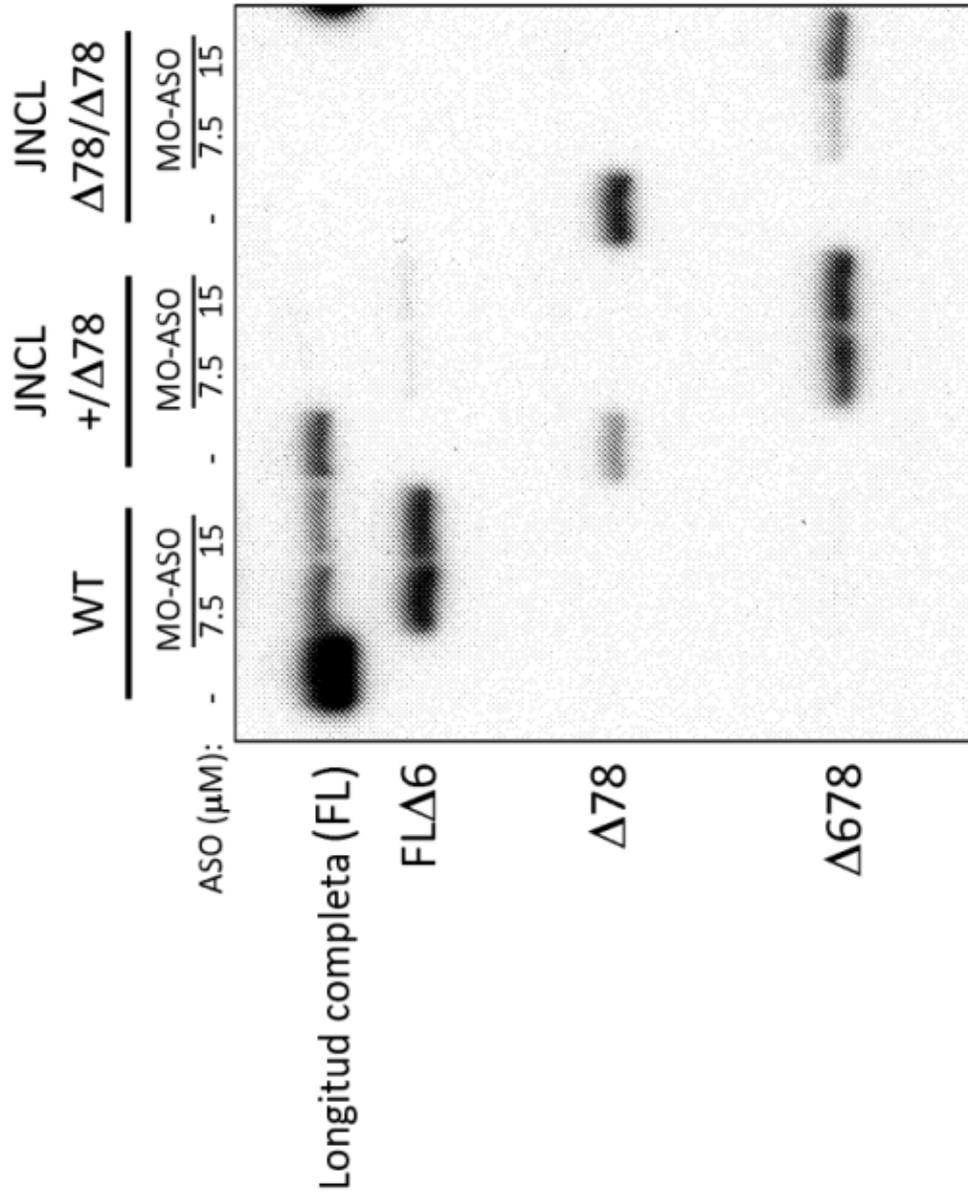


Figura 2

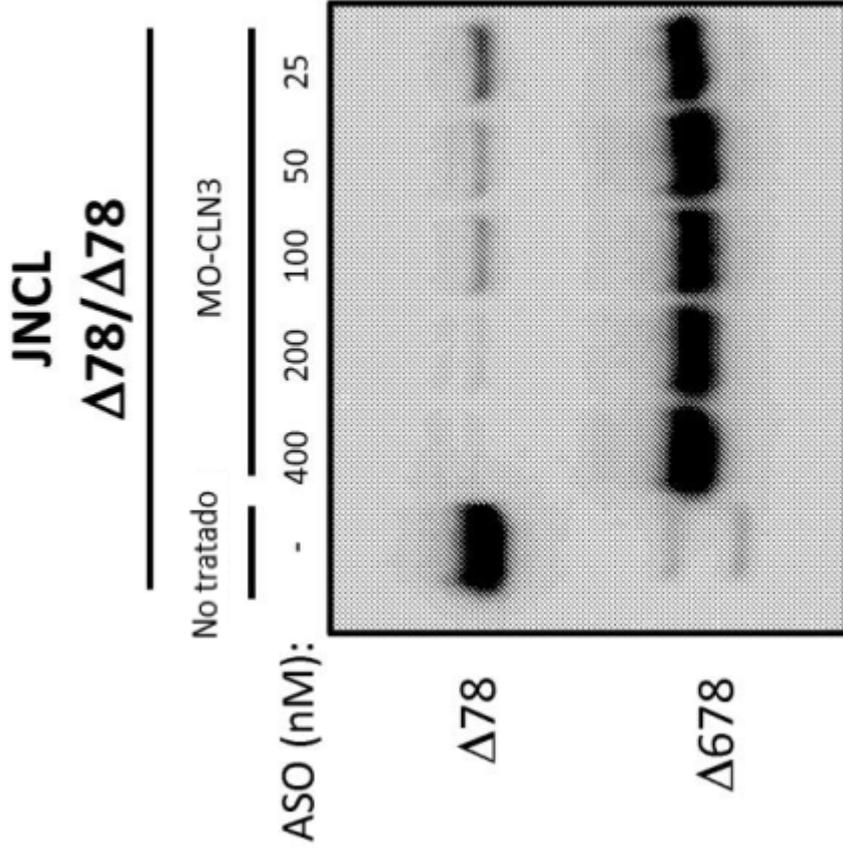


Figura 3

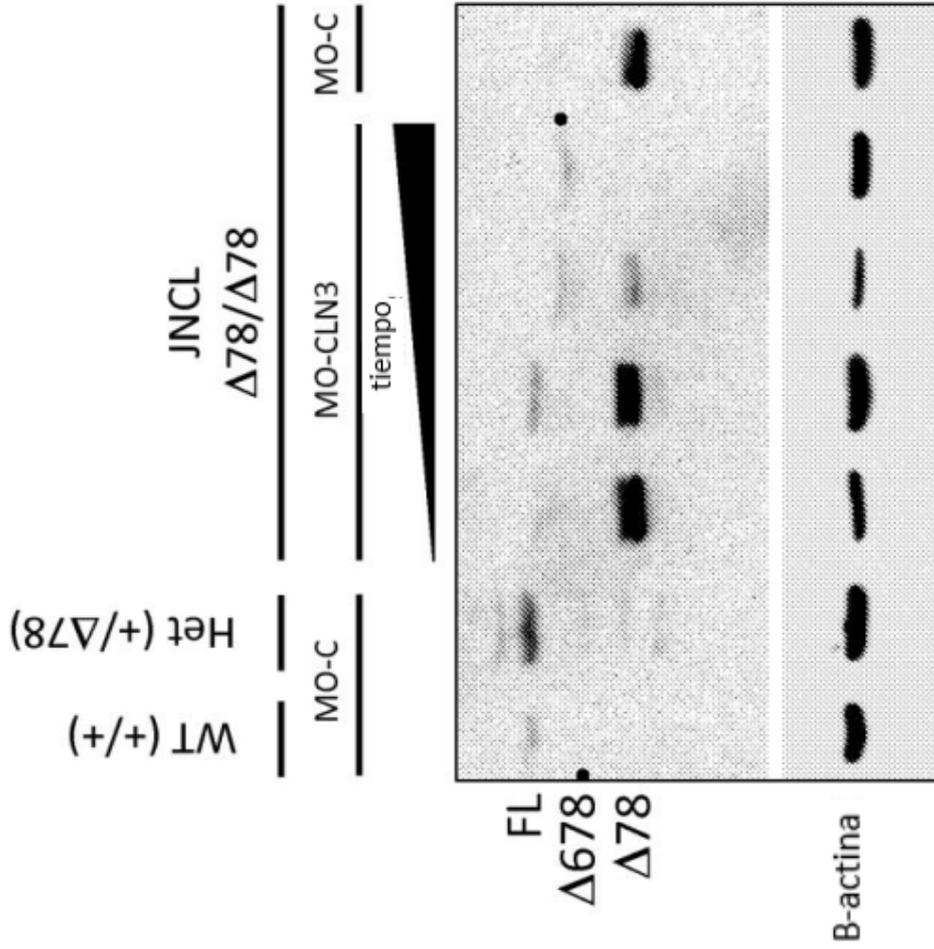


Figura 4

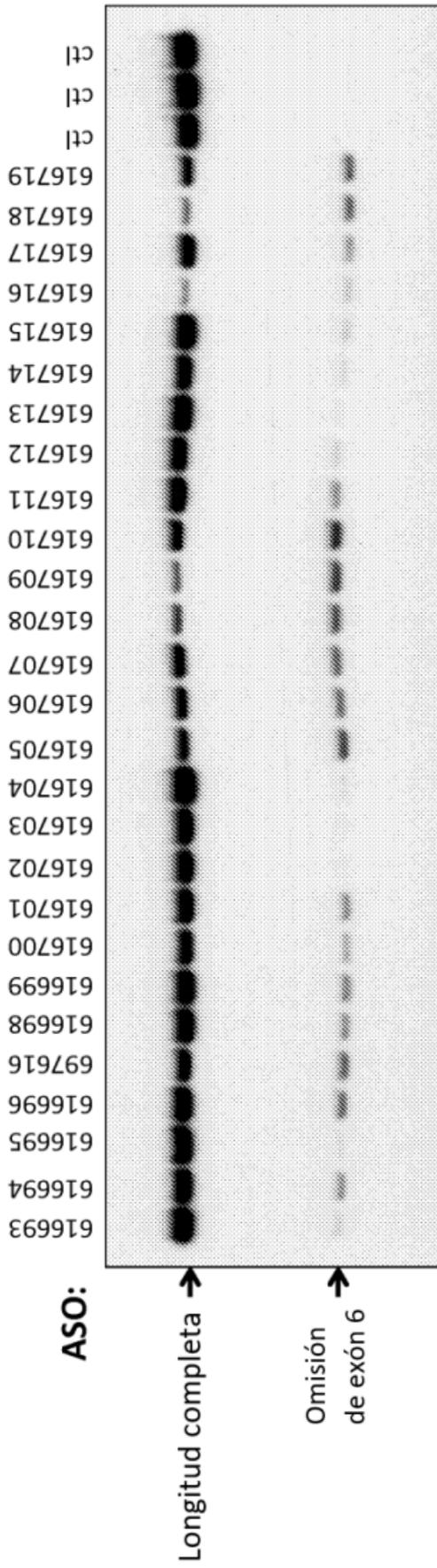
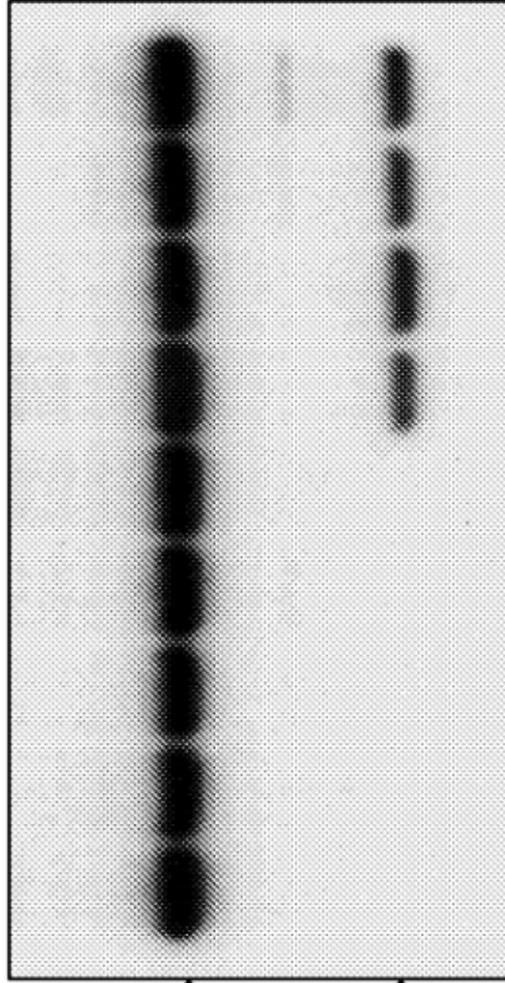


Figura 5



Ratones Batten CLN3  $\Delta 78/\Delta 78$

527134      616709



$\Delta 78$  →

$\Delta 678$  →

Figura 7

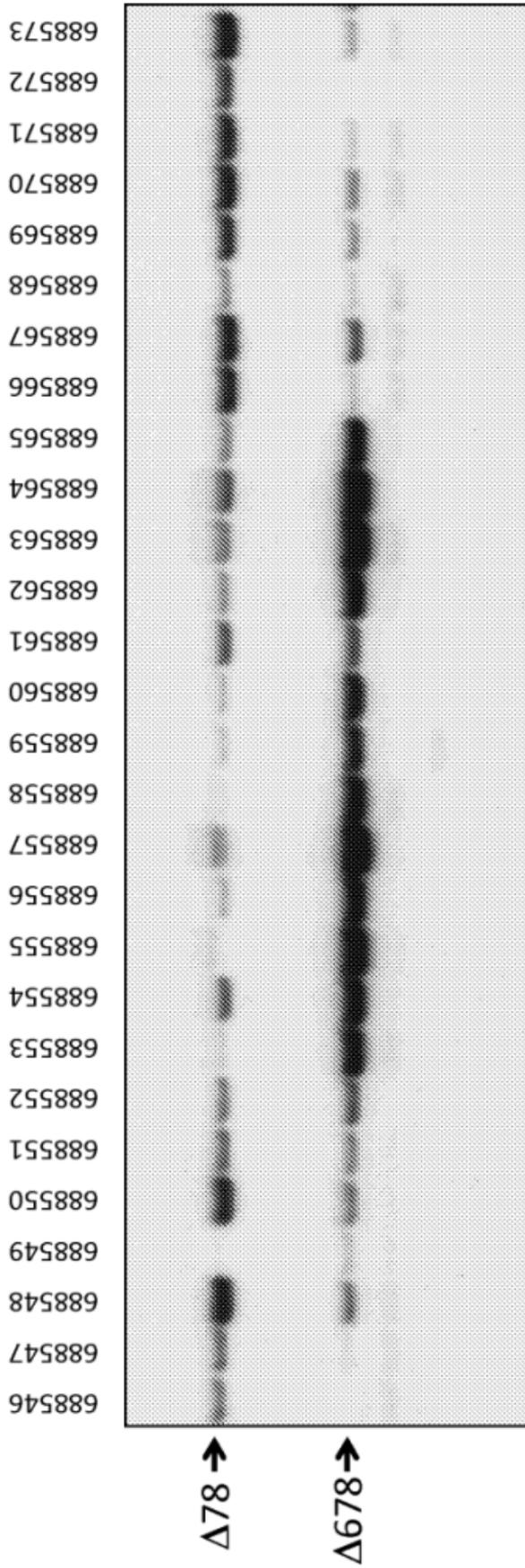


Figura 8

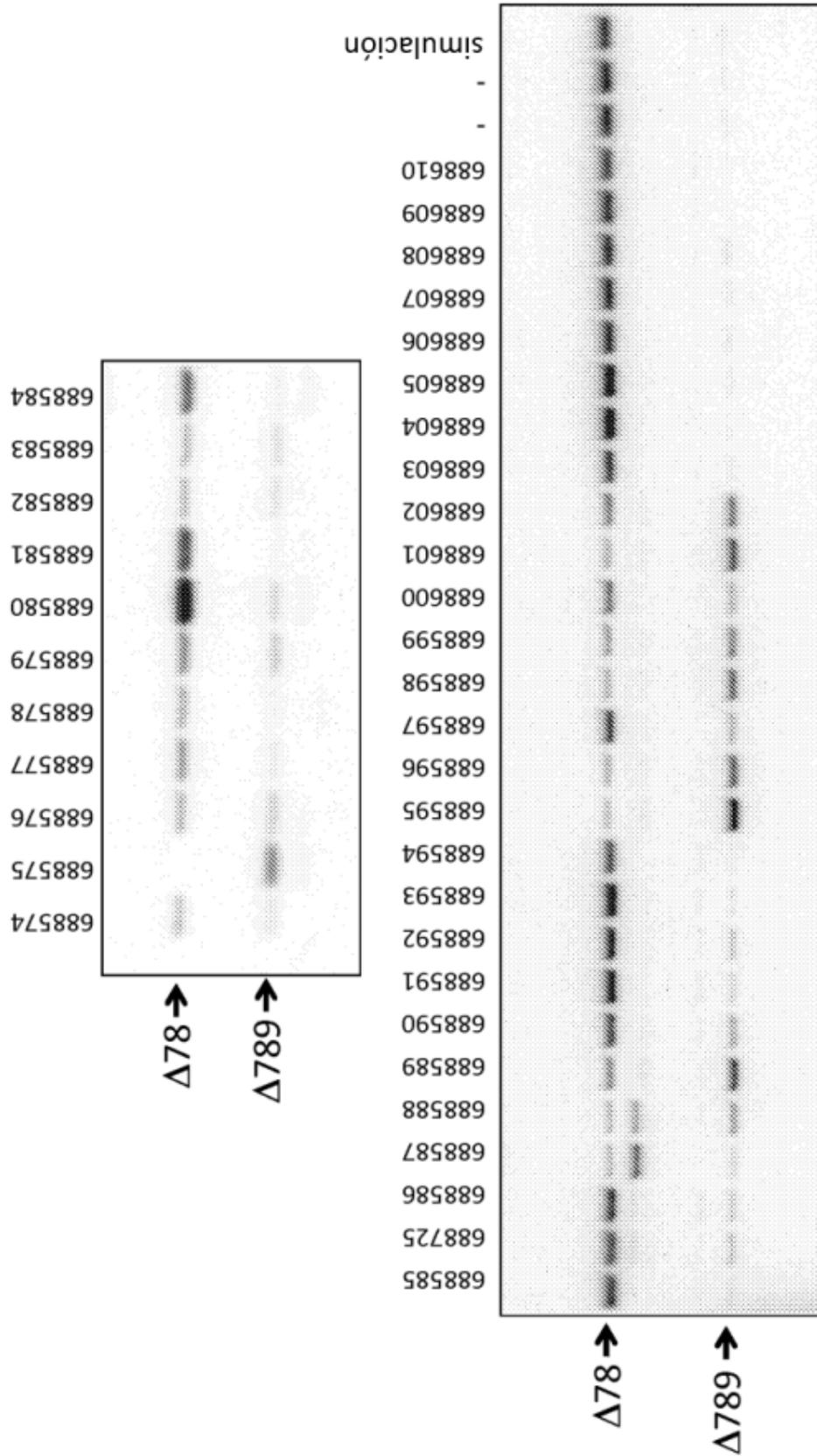


Figura 9

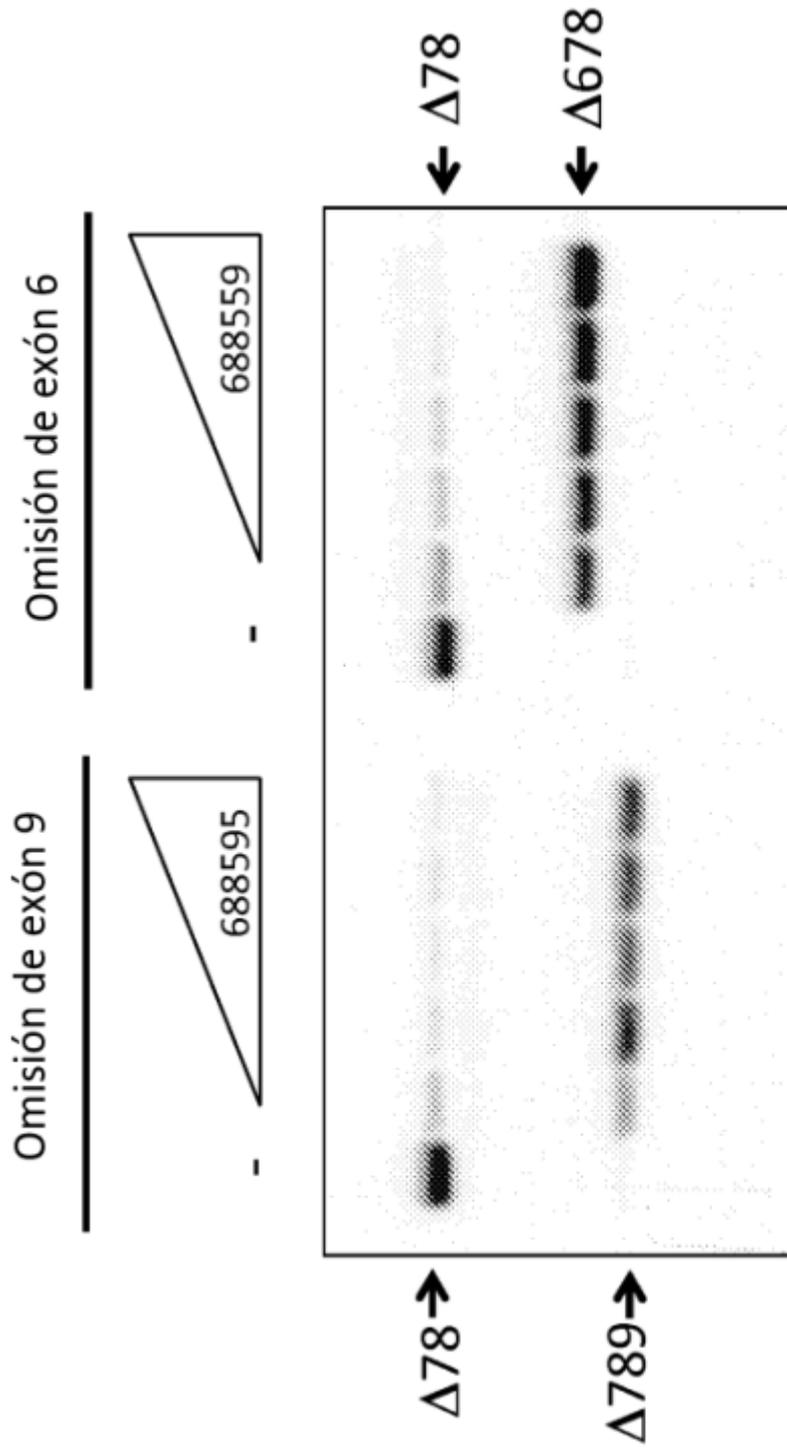


Figura 10