



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 325**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01) **A61K 31/711** (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01) **A61P 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05754344 .9**

96 Fecha de presentación : **28.06.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1766010**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.03.2007**

54

Título: **Oligonucleótidos antisentido para inducir la omisión de exón y métodos de uso de los mismos.**

30

Prioridad: **28.06.2004 AU 2004903474**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2011

73

Titular/es: **The University of Western Australia
35 Stirling Highway
Crawley, Western Australia 6009, AU**

72

Inventor/es: **Wilton, Stephen, Donald;
Fletcher, Sue y
McClore, Graham**

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 361 325 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

Oligonucleótidos antisentido para inducir la omisión de exón y métodos de uso de los mismos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos y composiciones antisentido novedosos adecuados para facilitar la omisión de exón. Proporciona también métodos para inducir la omisión de exón usando los compuestos antisentido novedosos así como composiciones terapéuticas adaptadas para uso en los métodos de la invención.

10 **Antecedentes de la técnica**

Se está dedicando un esfuerzo significativo actualmente a la búsqueda de métodos para suprimir o compensar mutaciones causantes de enfermedades en genes. Las tecnologías antisentido se están desarrollando usando una serie de químicas para afectar a la expresión génica a una variedad de niveles diferentes (transcripción, corte y empalme, estabilidad y traducción). Mucha de esa investigación se ha centrado en el uso de compuestos antisentido para corregir o compensar genes anormales o asociados a enfermedades en una pluralidad de afecciones diferentes.

Las moléculas antisentido son capaces de inhibir la expresión génica con suma especificidad y, debido a esto, muchos esfuerzos de investigación referentes a los oligonucleótidos como moduladores de la expresión génica se han centrado en inhibir la expresión de genes diana tales como oncogenes o genes víricos. Los oligonucleótidos antisentido están orientados hacia ARN (hebra codificante) o hacia ADN, donde forman estructuras triples que inhiben la transcripción por ARN polimerasa II. Para conseguir el efecto deseado en una regulación génica negativa específica, los oligonucleótidos deben promover la descomposición del ARNm diana o bloquear la traducción de ese ARNm, evitando así eficazmente la síntesis *de novo* de la proteína diana indeseable.

Dichas técnicas no son útiles cuando el objetivo es regular positivamente la producción de proteína nativa o compensar mutaciones que inducen la terminación prematura de la traducción, tales como mutaciones finalizadoras o de desplazamiento de marco.

Además, en casos en que una proteína normalmente funcional se termina prematuramente debido a las mutaciones en la misma, se ha mostrado que es posible un medio para restaurar cierta producción de proteína funcional por la tecnología antisentido mediante la intervención durante los procesos de corte y empalme (Sierakowska H, *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12840-12844; Wilton SD, *et al.*, (1999) *Neuromusc. Disorders* 9, 330-338; van Deutekom JC *et al.*, (2001) *Human Mol. Genet.* 10, 1547-1554). En estos casos, el transcrito génico defectivo no debe someterse a degradación dirigida, de modo que la química del oligonucleótido antisentido no promueva la descomposición del ARNm diana.

En una variedad de enfermedades genéticas, pueden modularse los efectos de las mutaciones sobre la expresión eventual de un gen mediante un proceso de omisión de exón dirigida durante el proceso de corte y empalme. El proceso de corte y empalme está regido por una maquinaria multipartícula compleja que pone en estrecha proximidad las conexiones exón-intrón adyacentes en el pre-ARNm y efectúa la escisión de los enlaces fosfodiéster en los extremos de los intrones, con su posterior reformación entre exones que se van a cortar y empalmar conjuntamente. Este proceso complejo y altamente preciso está mediado por motivos de secuencia en el pre-ARNm que son segmentos de ARN semiconservados relativamente cortos a los que se unen los diversos factores de corte y empalme nucleares que están entonces implicados en las reacciones de corte y empalme. Al cambiar el modo en que la maquinaria de corte y empalme lee o reconoce los motivos implicados en el procesamiento de pre-ARNm, es posible crear moléculas de ARNm cortadas y empalmadas diferencialmente. Se ha reconocido ahora que la mayoría de los genes humanos se cortan y empalman de forma alternativa durante la expresión génica normal, aunque no se han identificado los mecanismos implicados. Usando oligonucleótidos antisentido, se ha mostrado que los errores y deficiencias en un ARNm codificado podrían evitarse o eliminarse de los transcritos génicos maduros.

En la naturaleza, la extensión de la delección genética u omisión de exón en el proceso de corte y empalme no se entiende completamente, aunque se ha documentado que ocurre en muchos casos, generalmente a niveles muy bajos (Sherrat TG, *et al.*, (1993) *Am. J. Hum. Genet.* 53, 1007-1015). Sin embargo, se ha reconocido que si pueden eliminarse específicamente de algunos genes los exones asociados a mutaciones causantes de enfermedades, puede producirse a veces un producto proteico acertado que tiene propiedades biológicas similares a la proteína nativa o que tiene suficiente actividad biológica para mejorar la enfermedad causada por mutaciones asociadas al exón diana (Lu QL, *et al.*, (2003) *Nature Medicine* 9, 1009-1014; Aartsma-Rus A *et al.*, (2004) *Am. J. Hum. Genet.* 74: 83-92).

Este proceso de omisión de exón dirigida es probable que sea particularmente útil en genes largos cuando hay muchos exones e intrones, cuando hay redundancia en la constitución genética de los exones o cuando una proteína es capaz de funcionar sin uno o más exones particulares (por ejemplo, con el gen de distrofina, que consiste en 79 exones, o posiblemente algunos genes de colágeno que codifican bloques repetidos de secuencia o los enormes genes de nebulina o titina que comprenden ~80 y más de 370 exones, respectivamente).

Los esfuerzos para reorientar el procesamiento génico para el tratamiento enfermedades genéticas asociadas a truncamientos causados por mutaciones en diversos genes se han centrado en el uso de oligonucleótidos antisentido

que: (1) se superponen total o parcialmente con los elementos implicados en el proceso de corte y empalme, o (2) se unen al pre-ARNm en una posición suficientemente cercana al elemento para desestabilizar la unión y función de los factores de corte y empalme que mediarían normalmente una reacción de corte y empalme particular que ocurre en ese elemento (por ejemplo, se unen a pre-ARNm en una posición a 3, 6 o 9 nucleótidos del elemento a bloquear).

5

Por ejemplo, se ha notificado la modulación del corte y empalme de pre-ARNm de distrofina mutante con oligorribonucleótidos antisentido tanto *in vitro* como *in vivo*. En un tipo de mutación de distrofina notificado en Japón, una mutación de delección de 52 pares de bases causa que el exón 19 se elimine con los intrones flanqueantes durante el proceso de corte y empalme (Matsuo *et al.*, (1991) *J. Clin. Invest.* 87: 2127-2131). Se ha usado un sistema de corte y empalme de minigén *in vitro* para mostrar que un 2'-O-metiloligorribonucleótido de 31 unidades complementario de la mitad 5' de la secuencia eliminada en el exón 19 Kobe de distrofina inhibía el corte y empalme de pre-ARNm de tipo silvestre (Takeshima *et al.* (1995), *J. Clin. Invest.* 95, 515-520). Se usó el mismo oligonucleótido para inducir la omisión de exón del transcrito génico de distrofina nativa en células linfoblastoides cultivadas humanas.

10

15

Dunckley *et al.*, (1997) *Nucleosides & Nucleotides*, 16, 1665-1668 describieron constructos *in vitro* para el análisis del corte y empalme alrededor del exón 23 de distrofina mutada en el mutante *mdx* de ratón, un modelo de distrofia muscular. Se debatían planes para analizar estos constructos *in vitro* usando oligonucleótidos 2'-modificados dirigidos a sitios de corte y empalme en y adyacentes al exón 23 de distrofina de ratón, pero no se daban sitios ni secuencias diana.

20

Se notificó posteriormente que los 2'-O-metiloligorribonucleótidos corregían la deficiencia de distrofina en mioblastos de ratón *mdx* de este grupo. Se notificó que un oligonucleótido antisentido dirigido al sitio de corte y empalme 3' del intrón 22 de distrofina de múrido causaba la omisión del exón mutante, así como de varios exones flanqueantes, y creaba un transcrito de distrofina en fase novedoso con una delección interna novedosa. Esta distrofina mutada se expresaba en el 1-2% de los miotubos *mdx* tratados con antisentido. Se describe el uso de otras modificaciones oligonucleotídicas tales como 2'-O-metoxietilfosfodiésteres (Dunckley *et al.* (1998) *Human Mol. Genetics*, 5, 1083-90).

25

Por tanto, las moléculas antisentido pueden proporcionar una herramienta en el tratamiento de trastornos genéticos tales como la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Sin embargo, los intentos de inducir la omisión de exón usando moléculas antisentido han tenido un éxito variable. Los estudios sobre el exón 19 de distrofina, en que se conseguía una omisión exitosa de ese exón del pre-ARNm de distrofina usando una variedad de moléculas antisentido orientadas a sitios o motivos de corte y empalme flanqueantes en el exón, implicaban una definición de exón como se describe por Errington *et al.* (2003) *J. Gen. Med.* 5, 518-527.

35

En contraposición con la facilidad aparente de omisión del exón 19, la primera notificación de omisión del exón 23 en el ratón *mdx* por Dunckley *et al.* (1998) se considera ahora que notifica solo un transcrito revertiente o artefacto de origen natural en lugar de una actividad antisentido real. Además de no generar consistentemente transcritos con falta del exón 23, Dunckley *et al.* (1998) no mostraron ninguna evolución temporal de la omisión de exón inducida, ni siquiera la valoración de los oligonucleótidos antisentido, para demostrar los efectos dependientes de la dosis en que los niveles de omisión de exón correspondieran con cantidades crecientes o decrecientes de oligonucleótido antisentido. Además, este trabajo no pudo reproducirse por otros investigadores.

40

El primer ejemplo de omisión de exón específica y reproducible en el modelo de ratón *mdx* se notificó por Wilton *et al.*, (1999) *Neuromuscular Disorders* 9, 330-338. Al orientar una molécula antisentido al sitio de corte y empalme donante, se indujo una omisión consistente y eficaz del exón 23 en el ARNm de distrofina al cabo de 6 horas de tratamiento de las células cultivadas. Wilton *et al.* (1999) describen también dirigirse a la región aceptora del pre-ARNm de distrofina de ratón con oligonucleótidos antisentido más largos y ser incapaces de repetir los resultados publicados por Dunckley *et al.* (1998). No pudo detectarse reproduciblemente la omisión de exón, ni de 23 solo ni la eliminación múltiple de varios exones flanqueantes, usando una selección de oligonucleótidos antisentido orientados al sitio de corte y empalme aceptor del intrón 22.

50

Aunque el primer oligonucleótido antisentido orientado al sitio de corte y empalme donante del intrón 23 indujo una omisión de exón consistente en mioblastos cultivados primarios, se encontró que este compuesto era mucho menos eficaz en cultivos de células inmortalizadas que expresan mayores niveles de distrofina. Sin embargo, con una dirección y diseño de oligonucleótido antisentido refinados, se aumentó la eficacia de la eliminación de exón específico en casi un orden de magnitud (véase Mann CJ *et al.*, (2002) *J. Gen. Med.* 4, 644- 654).

55

Otras divulgaciones relativas a la terapia de DMD incluyen el documento CA 2507125 y Matsuo M. "Duchenne and Becker Muscular Dystrophy: From Gene Diagnosis to Molecular Therapy" *IUBMB LIFE*, vol. 53, nº 3, 1 de marzo de 2002 (01-03-2002), páginas 147-152, así como WO 2004/083446, publicado el 30 de septiembre de 2004.

60

Por tanto, continúa habiendo la necesidad de proporcionar oligonucleótidos antisentido capaces de unirse a y modificar el corte y empalme de una secuencia nucleotídica diana. Orientar simplemente los oligonucleótidos antisentido a motivos presuntamente cruciales para el corte y empalme no es garantía de eficacia de este compuesto en un entorno terapéutico.

65

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido que se une al gen de distrofina humana induciendo la omisión de exón en el gen de distrofina, consistente en la secuencia de SEQ ID NO: 181, opcionalmente en el que las bases de uracilo (U) son bases de timina (T).

La invención proporciona adicionalmente una composición que comprende una molécula antisentido según la invención con uno o más portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

La invención proporciona adicionalmente una molécula o composición antisentido según la invención para uso en un método de tratamiento de distrofia muscular en un paciente.

La invención se define adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas.

La elección de la selección de diana desempeña un papel crucial en la eficacia de la omisión de exón y por tanto su posterior aplicación de una terapia potencial. Diseñar simplemente moléculas antisentido para dirigir a regiones del pre-ARNm presuntamente implicadas en el corte y empalme no es garantía de inducción de una omisión de exón eficaz y específica. Las dianas más obvias o fácilmente definidas para intervención de corte y empalme son los sitios de corte y empalme donantes y aceptores, aunque hay motivos menos definidos o conservados que incluyen potenciadores exónicos de corte y empalme, elementos silenciadores y puntos de ramificación.

Los sitios de corte y empalme aceptores y donantes tienen secuencias consenso de aproximadamente 16 y 8 bases, respectivamente (véase la Figura 1 para una representación esquemática de los motivos y dominios implicados en el reconocimiento de exón, eliminación de intrón y el proceso de corte y empalme).

La invención trata también del uso de oligonucleótidos antisentido purificados y aislados de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad genética.

La invención puede usarse para tratar una afección caracterizada por distrofia muscular de Duchenne mediante la administración a un paciente necesitado de tratamiento de una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido diseñado apropiadamente de la invención relevante para la lesión genética particular en ese paciente.

Además, la invención puede usarse para tratar profilácticamente un paciente para prevenir o al menos minimizar la distrofia muscular de Duchenne, que comprende la etapa de: administrar al paciente una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido o una composición farmacéutica que comprende una o más de estas moléculas biológicas.

Se describen también en la presente memoria kits para tratar una enfermedad genética, comprendiendo dichos kits al menos un oligonucleótido antisentido de la presente invención, envasado en un envase adecuado y con instrucciones para su uso.

Resultarán evidentes para los especialistas en la materia otros aspectos y ventajas de la invención a partir de una revisión de la descripción siguiente, que continúa con referencia a las siguientes figuras.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática de los motivos y dominios implicados en el reconocimiento de exón, la eliminación de intrón y el proceso de corte y empalme.

Figura 2. Representación en un diagrama del concepto de omisión de exón inducida por oligonucleótido antisentido para evitar las mutaciones causantes de enfermedades (no dibujado a escala). La casilla tramada representa un exón que porta una mutación que evita la traducción del resto del ARNm a una proteína. La barra negra representa un oligonucleótido antisentido que evita la inclusión de ese exón en el ARNm maduro.

Se describen en la Tabla 1 de los ejemplos los oligonucleótidos antisentido de 2'-O-metilfosforotioato que se han usado para estudiar la omisión de exón inducida durante el procesamiento de pre-ARNm de distrofina. Puesto que estos oligonucleótidos de 2'-O-metilo antisentido son más de tipo ARN, U representa uracilo. Con otras químicas antisentido tales como ácidos nucleicos peptídicos o morfolinós, estas bases U pueden mostrarse como "T".

Descripción detallada de la invención

Generalidades

Los especialistas en la materia apreciarán que la invención descrita en la presente memoria es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Ha de entenderse que la invención incluye todas dichas variaciones y modificaciones. La invención incluye también todas las etapas, rasgos, composiciones y compuestos designados o indicados en la memoria descriptiva, individual o colectivamente, y todas y cada una de las combinaciones de dos cualquiera o más de las etapas o rasgos.

ES 2 361 325 T3

El alcance de la presente invención no se va a limitar a las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, que se pretenden solo con fines de ejemplificación. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la invención como se describe en la presente memoria.

5 Los números de identidad de secuencia (SEQ ID NO) que contienen la información de secuencia nucleotídica y aminoacídica incluidos en esta memoria descriptiva se recogen al final de la descripción y se han preparado usando el programa PatentIn versión 3.0. Cada secuencia nucleotídica o aminoacídica se identifica en la lista de secuencias por el indicador numérico <210> seguido por el identificador de secuencia (por ejemplo, <210> 1, <210> 2, etc.). La longitud, tipo de secuencia y organismo fuente para cada secuencia nucleotídica o aminoacídica se indican por
10 la información proporcionada en los campos indicadores numéricos <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas designadas en la memoria descriptiva se definen por la información proporcionada en el campo indicador numérico <400> seguido por el identificador de secuencia (por ejemplo, <400> 1, <400> 2, etc.).

15 Se ha propuesto y publicado un sistema de nomenclatura de moléculas antisentido para distinguir entre las diferentes moléculas antisentido (véase Mann *et al.* (2000), *J. Gen. Med.* 4, 644-654). Esta nomenclatura se vuelve especialmente relevante cuando se ensayan varias moléculas antisentido ligeramente diferentes, todas orientadas a la misma región diana, como se muestra a continuación:

20
H # A/D (x:y)

La primera letra designa la especie (por ejemplo, H: humano, M: murino, C: canino).

25 “#” designa el número de exón de diana.

“A/D” indica sitio de corte y empalme aceptor o donante al inicio y al final del exón, respectivamente.

30 (x:y) representa las coordenadas de asociación en que “-” o “+” indican secuencias intrónicas o exónicas, respectivamente. Como ejemplo, A(-6+18) indicaría las 6 últimas bases del intrón que precede al exón diana y las primeras 18 bases del exón diana. El sitio de corte y empalme más cercano sería el aceptor, así que estas coordenadas estarían precedidas por una “A”. La descripción de las coordenadas de asociación en el sitio de corte y empalme donante podría ser D(+2-18), en que las 2 últimas bases exónicas y las 18 primeras bases intrónicas corresponden al sitio de asociación de la molécula antisentido. Las coordenadas de asociación enteramente exónicas se representarían por A(+65+85), es decir, el sitio entre el nucleótido 65 y 85 desde el inicio del exón.
35

No se admite que ninguna de las referencias constituya la técnica anterior o sea parte del conocimiento general común de los que trabajan en el campo al que se refiere esta invención.

40 Como se usa necesariamente en la presente memoria, el término “derivado” y “derivado de” deberá considerarse que indica que puede obtenerse un entero específico a partir de una fuente particular aunque no directamente a partir de esa fuente.

45 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “comprendiendo”, se entenderá que implica la inclusión de un entero o un grupo de enteros dados, pero no la exclusión de ningún otro entero o grupo de enteros.

50 Pueden encontrarse otras definiciones para términos seleccionados usados en la presente memoria en la descripción detallada de la invención, y se aplican en toda ella. A menos que se defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un especialista en la materia a la que pertenece la invención.

Descripción de la realización preferida

55 Cuando se dirige una molécula o moléculas antisentido a secuencias nucleotídicas implicadas en el corte y empalme de exones en secuencias de pre-ARNm, el corte y empalme normal del exón puede inhibirse, causando que la maquinaria de corte y empalme evite el exón mutado completo del ARNm maduro. El concepto de omisión de exón inducida por oligonucleótido antisentido se muestra en la Figura 2. En muchos genes, la delección de un exón entero conduciría a la producción de una proteína no funcional por la pérdida de dominios funcionales importantes o la desestabilización del marco de lectura. Sin embargo, en algunas proteínas es posible acortar la proteína eliminando uno o más exones sin desestabilizar el marco de lectura en la proteína y sin alterar gravemente la actividad biológica de la proteína. Típicamente, dichas proteínas tienen un papel estructural y/o poseen dominios funcionales en sus extremos. La presente invención describe moléculas antisentido capaces de unirse a dianas de pre-ARNm de distrofina especificadas y de reorientar el procesamiento de ese gen.
60
65

Moléculas antisentido

Según un primer aspecto de la invención, se proporcionan moléculas antisentido como se definen en las reivindicaciones capaces de unirse a una diana seleccionada para inducir la omisión de exón. Diseñar moléculas antisentido para enmascarar completamente sitios de corte y empalme de consenso puede no generar necesariamente la omisión del exón diana. Además, los inventores han descubierto que el tamaño o longitud del oligonucleótido antisentido mismo no es siempre un factor primario cuando se diseñan moléculas antisentido. Con algunas dianas tales como el exón 19, oligonucleótidos antisentido tan cortos como de 12 bases fueron capaces de inducir la omisión de exón, aunque no tan eficazmente como oligonucleótidos más largos (20-31 bases). En algunas otras dianas, tales como el exón 23 de distrofina de mardo, oligonucleótidos antisentido de solo 17 restos fueron capaces de inducir más eficazmente la omisión que otro compuesto superpuesto de 25 nucleótidos.

Los inventores han descubierto también que no parece haber ningún motivo estándar que puede bloquearse o enmascararse por las moléculas antisentido para reorientar el corte y empalme. En algunos exones, tales como el exón 23 de distrofina de ratón, el sitio de corte y empalme donante era el más susceptible de dirigirse a reorientar la omisión de ese exón. Debe observarse que el diseño y ensayo de una serie de moléculas antisentido específicas del exón 23 para asociarse con regiones superpuestas del sitio de corte y empalme donante mostraron una variación considerable de la eficacia de la omisión de exón inducida. Como se notifica en Mann *et al.* (2002), había una variación significativa en la eficacia de la evitación de la mutación finalizadora dependiendo de la asociación con oligonucleótido antisentido (“Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy”, *J. Gen. Med.*: 644-654). Se encontró que dirigirse al sitio aceptor del exón 23 o varios dominios internos no inducía ninguna omisión consistente del exón 23.

En otros exones dirigidos a eliminación, enmascarar el sitio de corte y empalme donante no inducía ninguna omisión de exón. Sin embargo, al orientar las moléculas antisentido al sitio de corte y empalme aceptor (exón 8 humano), se indujo una omisión de exón fuerte y mantenida. Debe observarse que la eliminación del exón 8 humano estaba estrechamente ligada a la eliminación conjunta del exón 9. No hay una alta homología de secuencia entre los oligonucleótidos antisentido del exón 8 y las correspondientes regiones del exón 9, de modo que no parece que sea una cuestión de reacción cruzada. En lugar de ello, el corte y empalme de estos dos exones está inextricablemente ligado. Este no es un caso aislado, ya que se observa el mismo efecto en células caninas en que dirigir el exón 8 a eliminación daba también como resultado la omisión del exón 9. Dirigir el exón 23 a eliminación en pre-ARNm de distrofina de ratón da también como resultado la frecuente eliminación del exón 22. Este efecto ocurre de manera dependiente de la dosis e indica también un procesamiento estrechamente coordinado de dos exones adyacentes.

En otros exones diana, las moléculas antisentido orientadas a los sitios de corte y empalme donantes o aceptores no inducían omisión de exón, mientras que asociar moléculas antisentido con regiones intraexónicas (concretamente, potenciadores del corte y empalme de exón en el exón 6 de distrofina humana) era más eficaz para inducir la omisión de exón. Algunos exones, tanto el exón 19 de ratón como humano, por ejemplo, se omiten fácilmente dirigiendo moléculas antisentido a una variedad de motivos. Es decir, la omisión de exón dirigida se induce después de usar oligonucleótidos antisentido para enmascarar los sitios de corte y empalme donantes y aceptores o los potenciadores del corte y empalme de exón.

Para identificar y seleccionar oligonucleótidos antisentido adecuados para uso en la modulación de la omisión de exón, debe identificarse en primer lugar una secuencia de ácido nucleico cuya función se vaya a modular. Esta puede ser, por ejemplo, un gen (o ARNm transcrito a partir de un gen) cuya expresión esté asociada a un trastorno o estado patológico particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En el contexto de la presente invención, el sitio o sitios diana preferidos son aquellos implicados en el corte y empalme de ARNm (concretamente, sitios donantes de corte y empalme, sitios aceptores de corte y empalme o elementos potenciadores del corte y empalme exónico). Los puntos de ramificación de corte y empalme y secuencias de reconocimiento de exón o potenciadores del corte y empalme son también sitios diana potenciales para la modulación del corte y empalme de ARNm.

Preferiblemente, la presente invención tiene el objetivo de proporcionar moléculas antisentido capaces de unirse a una diana seleccionada en pre-ARNm de distrofina para inducir una omisión de exón eficaz y consistente. La distrofia muscular de Duchenne surge por mutaciones que impiden la síntesis de un producto génico de distrofina funcional. Estos defectos génicos de distrofia muscular de Duchenne son típicamente mutaciones finalizadoras o redistribuciones genómicas tales como deleciones, duplicaciones o microdeleciones o inserciones que desestabilizan el marco de lectura. Como el gen de distrofina humana es un gen grande y complejo, con los 79 exones que se cortan y empalman conjuntamente generando un ARNm maduro con un marco de lectura abierto de aproximadamente 11.000 bases, hay muchas posiciones en que pueden ocurrir estas mutaciones. Por consiguiente, una terapia integral basada en oligonucleótidos antisentido para tratar muchas de las mutaciones causantes de enfermedades diferentes en el gen de distrofina requerirá que puedan dirigirse muchos exones a eliminación durante el proceso de corte y empalme.

En el contexto de la presente invención, el sitio o sitios diana preferidos son aquellos implicados en el corte y empalme de ARNm (concretamente, sitios donantes de corte y empalme, sitios aceptores de corte y empalme o elementos potenciadores de corte y empalme exónico). Los puntos de ramificación de corte y empalme y secuencias de reconocimiento de exón o potenciadores de corte y empalme son también sitios diana potenciales para la modulación del corte y empalme de ARNm.

ES 2 361 325 T3

Los oligonucleótidos y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de las correspondientes posiciones en cada molécula está ocupado por nucleótidos que pueden unirse por puente de hidrógeno entre sí. Por tanto, “específicamente hibridable” y “complementario” son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso tal que ocurra una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el ADN o ARN diana. Se entiende en la técnica que la secuencia de una molécula antisentido no tiene que ser 100% complementaria de su secuencia diana para ser específicamente hibridable. Una molécula antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto con la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana causando la pérdida de utilidad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido con secuencias no diana en condiciones en que se desee la unión específica, concretamente, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones en que se efectúen los ensayos.

Aunque el método anterior puede usarse para seleccionar moléculas antisentido capaces de eliminar cualquier exón de una proteína que pueda acortarse sin afectar a su función biológica, la delección de exón no debe conducir a un desplazamiento del marco de lectura en el ARNm transcrito acortado. Por tanto, si en una secuencia lineal de tres exones el final del primer exón codifica dos de los tres nucleótidos de un codón y el siguiente exón se elimina, entonces el tercer exón en la secuencia lineal debe empezar con un nucleótido individual que es capaz de completar el triplete nucleotídico de un codón. Si el tercer exón no comienza con un nucleótido individual, habrá un desplazamiento del marco de lectura que conduciría a la generación de proteína truncada o no funcional.

Se apreciará que las disposiciones de codón al final de los exones en proteínas estructurales pueden no romperse siempre al final de un codón, por consiguiente, puede haber la necesidad de eliminar más de un exón del pre-ARNm para asegurar la lectura en fase del ARNm. En dichas circunstancias, pueden tener que seleccionarse una pluralidad de oligonucleótidos antisentido mediante el método de la invención, en el que cada uno se orienta a una región diferente responsable de la inducción de corte y empalme en los exones que se van a eliminar.

La longitud de una molécula antisentido puede variar a condición de que sea capaz de unirse selectivamente a la localización pretendida en la molécula de pre-ARNm. La longitud de dichas secuencias puede determinarse según procedimientos de selección descritos en la presente memoria. Generalmente, la molécula antisentido será de aproximadamente 10 nucleótidos de longitud hasta aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. Se apreciará, sin embargo, que puede usarse en el método cualquier longitud de nucleótidos dentro de este intervalo. Preferiblemente, la longitud de la molécula antisentido está entre 17 y 30 nucleótidos de longitud.

Para determinar cuáles exones pueden estar conectados en un gen de distrofina, debe hacerse referencia a un mapa de límites de exones. La conexión de un exón con otro está basada en los exones que poseen el mismo número en el límite 3' que está presente en el límite 5' del exón al que está conectado. Por lo tanto, si se eliminara el exón 7, el exón 6 debe conectarse con los exones 12 o 18 para mantener el marco de lectura. Por tanto, tendrían que seleccionarse oligonucleótidos antisentido que reorientaran el corte y empalme a los exones 7 a 11 en el primer caso o a los exones 7 a 17 en el segundo caso. Otro enfoque y algo más sencillo para restaurar el marco de lectura alrededor de la delección del exón 7, sería retirar los dos exones flanqueantes. La inducción de la omisión de los exones 6 y 8 debe dar como resultado un transcrito en fase con el corte y empalme de los exones 5 a 9. Sin embargo, en la práctica, dirigir el exón 8 a eliminación del pre-ARNm da como resultado la eliminación conjunta del exón 9, de modo que el transcrito resultante tendría el exón 5 unido al exón 10. La inclusión o exclusión del exón 9 no altera el marco de lectura. Una vez se han identificado las moléculas antisentido para ensayar, se preparan según técnicas estándares conocidas en la técnica. El método más común para producir moléculas antisentido es la metilación de la posición 2'-hidroxirribosa; la incorporación de una cadena principal de fosforotioato produce moléculas que se parecen superficialmente al ARN, pero que son mucho más resistentes a la degradación por nucleasa.

Para evitar la degradación del pre-ARNm durante la formación de dúplex con las moléculas antisentido, las moléculas antisentido usadas en el método pueden adaptarse para minimizar o evitar la escisión por ARNasa H endógena. Esta propiedad es muy preferida, ya que el tratamiento del ARN con los oligonucleótidos no metilados, de forma intracelular o en extractos brutos que contienen ARNasa H, conduce a la degradación de los dúplex de pre-ARNm:oligonucleótidos antisentido. Puede usarse en el presente método cualquier forma de moléculas antisentido modificadas que sea capaz de evitar o no inducir dicha degradación. Son un ejemplo de moléculas antisentido que cuando forman dúplex con ARN no se escinden por ARNasa H celular los derivados de 2'-O-metilo. Los 2'-O-metiloligorribonucleótidos son muy estables en entorno celular y en tejidos animales, y sus dúplex con ARN tienen mayores valores de Tm que sus contrapartidas ribo o desoxirribo.

Pueden prepararse moléculas antisentido que no activan la ARNasa H según técnicas conocidas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.149.797). Dichas moléculas antisentido, que pueden ser secuencias desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas, contienen simplemente cualquier modificación estructural que impide estéricamente o evita la unión de ARNasa H a una molécula dúplex que contiene el oligonucleótido como un miembro del mismo, no reduciendo ni desestabilizando esencialmente la formación de dúplex dicha modificación estructural. Debido a que las porciones del oligonucleótido implicadas en la formación de dúplex son sustancialmente diferentes de las porciones implicadas en la unión a ARNasa H del mismo, están disponibles numerosas moléculas antisentido que no activan la ARNasa H. Por ejemplo, dichas moléculas antisentido pueden ser oligonucleótidos en los que al menos uno, o todos, los restos fosfato de puente internucleotídico son fosfatos modificados tales como metilfosfonatos, metilfosforotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforamidatos. Por ejemplo, uno de cada dos de los restos

fosfato de puente internucleotídico puede estar modificado como se describe. En otro ejemplo no limitante, dichas moléculas antisentido son moléculas en las que al menos uno, o todos, los nucleótidos contienen un resto 2'-alquilo inferior (por ejemplo, alquilo C₁-C₄ lineal o ramificado, saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo e isopropilo). Por ejemplo, uno de cada dos nucleótidos puede estar modificado como se describe.

Aunque los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida de moléculas antisentido, la presente invención comprende otras moléculas antisentido oligoméricas incluyendo, pero sin limitación, miméticos oligonucleotídicos tales como se describen a continuación.

Los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles en esta invención incluyen oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas o ligamientos internucleosídicos no naturales. Como se define en esta memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Con los fines de esta memoria descriptiva, y como a veces se refiere en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica pueden considerarse también oligonucleosidos.

En otros miméticos oligonucleotídicos preferidos, tanto el azúcar como el ligamiento internucleosídico, concretamente la cadena principal de las unidades nucleotídicas, se reemplazan por grupos novedosos. Las unidades básicas se mantienen para hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Se designa uno de dichos compuestos oligoméricos, un mimético oligonucleotídico que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, como un ácido nucleico peptídico (ANP). En los compuestos ANP, se reemplaza la cadena principal de azúcar del oligonucleótido por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno azoicos de la porción amida de la cadena principal.

Los oligonucleótidos modificados pueden contener también uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos pueden incluir también modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo designadas en la técnica simplemente como "bases"). Ciertas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2-, N-6- y O-6-sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones de 5-metilcitosina se ha mostrado que aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C y son las sustituciones de base actualmente preferidas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietilazúcar.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica el ligamiento químico del oligonucleótido con uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen, pero sin limitación, restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3H-fosfonato de trietilamonio, una cadena de poliamina o polietilenglicol o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo o un resto octadecilamina o hexilaminocarboniloxicolesterol.

No es necesario que todas las posiciones de un compuesto dado estén modificadas uniformemente, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse a un solo compuesto o incluso a un solo nucleosido en un oligonucleótido. La presente invención incluye también compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Los compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son moléculas antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, constituida cada una por al menos una unidad monomérica, concretamente, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleotídico. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado de modo que se confiera una resistencia aumentada a la degradación por nucleasa y una captación celular aumentada, y una región adicional de afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana.

Métodos de fabricación de moléculas antisentido

Las moléculas antisentido usadas según esta invención pueden prepararse conveniente y rutinariamente mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipamiento para dicha síntesis se vende por varios distribuidores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Se describe un método para sintetizar oligonucleótidos en un soporte sólido modificado en la patente de EE.UU. n° 4.458.066.

Puede emplearse adicionalmente o como alternativa cualquier otro medio conocido en la técnica para dicha síntesis. Es bien conocido usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. En una de dichas realizaciones automatizadas, se usan dietilfosforamiditas como materiales de partida y pueden sintetizarse como se describe por Beaucage *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters* 22: 1859-1862.

Las moléculas antisentido de la invención se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico, ni constructos vectoriales genéticos diseñados para orientar la síntesis *in vivo* de moléculas antisentido. Las moléculas de la invención pueden también mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro mo-

ES 2 361 325 T3

do con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar a la captación, distribución y/o absorción.

5 *Agentes terapéuticos*

La presente invención puede usarse también como agente profiláctico o terapéutico, que puede utilizarse con el fin de tratamiento de una enfermedad genética.

10 En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona moléculas antisentido que se unen a una diana seleccionada en el pre-ARNm de distrofina para inducir una omisión de exón eficaz y consistente descrita en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz, mezcladas con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 La expresión “farmacéuticamente aceptable” designa entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o similar adversa, tal como incomodidad gástrica y similares, cuando se administran a un paciente. El término “portador” designa un diluyente, coadyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles tales como agua y aceites, incluyendo aquellos del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Se emplean preferiblemente como portadores agua o disoluciones salinas y dextrosa acuosa y disoluciones de glicerol, particularmente para disoluciones inyectables. Se describen portadores farmacéuticos adecuados en Martin, “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

25 En una forma más específica de la invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de una molécula antisentido junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, coadyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica y aditivos tales como detergentes y agentes solubilizantes (por ejemplo, Tween 80, Polysorbate 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, tiomersal, alcohol bencílico) y sustancias voluminizadoras (por ejemplo, lactosa, manitol). El material puede incorporarse a composiciones particuladas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc. o a liposomas. Puede usarse también ácido hialurónico. Dichas composiciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de excreción *in vivo* de las presentes proteínas y derivados. Véase, por ejemplo, Martin, “Remington’s Pharmaceutical Sciences”, 18ª ed., (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042), páginas 1435-1712. Las composiciones pueden prepararse en forma líquida o pueden estar en forma seca, tal como en forma liofilizada.

35 Se apreciará que las composiciones farmacéuticas proporcionadas según la presente invención pueden administrarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas para administración se administran mediante inyección, por vía oral o por vía pulmonar o nasal. Las moléculas antisentido se suministran más preferiblemente por vías de administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea.

45 *Terapia basada en moléculas antisentido*

La presente invención trata también del uso de moléculas antisentido de la presente invención para la fabricación de un medicamento para la modulación de una enfermedad genética.

50 El suministro de una cantidad terapéuticamente eficaz de moléculas antisentido puede conseguirse mediante métodos publicados anteriormente. Por ejemplo, el suministro intracelular de la molécula antisentido puede ser mediante una composición que comprende una mezcla de la molécula antisentido y una cantidad eficaz de un copolímero en bloques. Se describe un ejemplo de este método en la solicitud de patente de EE.UU. 20040248833.

55 Se describen otros métodos de suministro de moléculas antisentido al núcleo en Mann C.J. *et al.* (2001) [“Antisense-induced exon skipping and the synthesis of dystrophin in the mdx mouse”, *Proc. Natl. Acad. Science* 98(1), 42-47] y en GebSKI *et al.* (2003) *Human Molecular Genetics*, 12(15): 1801-1811.

Se describe en la patente de EE.UU. 6.806.084 un método para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula a modo de vector de expresión en forma de ADN desnudo o complejo con portadores lipídicos.

60 Puede ser deseable suministrar la molécula antisentido en un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas o formulaciones liposómicas.

65 Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de suministro *in vitro* e *in vivo*. Estas formulaciones pueden tener características de carga neta catiónica, aniónica o neutra, y son características útiles con métodos de suministro *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Se ha mostrado que las vesículas unilamelares grandes (VUG), que se encuentran en el intervalo de tamaño de 0,2-4,0 μ m, pueden encapsular un porcentaje sustancial de

ES 2 361 325 T3

un tampón acuoso que contiene macromoléculas grandes. Pueden encapsularse ARN y ADN en el interior acuoso y suministrarse a células en una forma biológicamente activa (Fraley *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 6:77, 1981).

Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia génica eficaz, deben estar presentes las siguientes características: (1) encapsulación de la molécula antisentido de interés con alta eficacia aunque sin comprometer su actividad biológica; (2) unión preferida y sustancial a una célula diana en comparación con células no diana; (3) suministro de los contenidos acuosos de la vesícula al citoplasma de la célula diana con alta eficacia y (4) expresión exacta y eficaz de la información genética (Mannino *et al.*, *Biotechniques*, 6: 682, 1988).

La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, particularmente fosfolípidos de alta temperatura de transición de fase, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. Pueden usarse también otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, fuerza iónica y la presencia de cationes divalentes.

Como alternativa, el constructo antisentido puede combinarse con otros portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables produciendo una composición farmacéutica. Los portadores y diluyentes adecuados incluyen disoluciones salinas isotónicas, por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica.

Las vías de administración descritas se pretenden solo como guía, puesto que un especialista será capaz de determinar fácilmente la vía de administración óptima y cualquier dosificación para cualquier animal y afección particular. Se han intentado múltiples enfoques para introducir nuevo material genético funcional en células, tanto *in vitro* como *in vivo* (Friedmann (1989) *Science* 244: 1275-1280).

Estos enfoques incluyen la integración del gen para expresar en retrovirus modificados (Friedmann (1989) *supra*; Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(8), supl; 5074S-5079S); la integración en vectores no retrovíricos (Rosenfeld *et al.* (1992) *Cell* 68: 143-155; Rosenfeld *et al.* (1991) *Science*, 252: 431-434); o el suministro de un transgén ligado a un elemento promotor-potenciador heterólogo mediante liposomas (Friedmann (1989), *supra*; Brigham *et al.* (1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298: 278-281; Nabel *et al.* (1990) *Science*, 249: 1285-1288; Hazinski *et al.* (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.* 4: 206-209 y Wang y Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84: 7851-7855); acoplado con sistemas de transporte específicos de ligando basados en catión (Wu y Wu (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 14621-14624) o el uso de vectores de expresión de ADN desnudo (Nabel *et al.* (1990) *supra*); Wolf *et al.* (1990) *Science*, 247: 1465-1468). La inyección directa de transgenes en tejido produce solo expresión localizada (Rosenfeld (1992) *supra*); Rosenfeld *et al.* (1991) *supra*; Brigham *et al.* (1989) *supra*; Nabel (1990) *supra*) y Hazinski *et al.* (1991) *supra*). El grupo de Brigham *et al.* (*Am. J. Med. Sci.* (1989) 298: 278-281 y *Clinical Research* (1991) 39 (resumen)) han notificado la transfección *in vivo* solo de pulmones de ratón después de la administración intravenosa o intratraqueal de un complejo de ADN-liposoma. Es un ejemplo de un artículo de revisión de procedimientos de terapia génica humana: Anderson, *Science* (1992) 256: 808-813.

Las moléculas antisentido de la invención comprenden cualquier sal, éster o sal de dichos ésteres farmacéuticamente aceptable o cualquier otro compuesto que, tras administración a un animal incluyendo un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo del mismo. En consecuencia, por ejemplo, la divulgación está también dirigida a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, a sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y a otros bioequivalentes.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" designa sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, concretamente, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y que no confieren efectos toxicológicos indeseados al mismo.

Para oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido alginico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico y similares y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una serie de modos dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y de la zona a tratar. La administración puede ser administración tópica (incluyendo las membranas oftálmica y mucosa, incluyendo suministro rectal), pulmonar, por ejemplo mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles (incluyendo mediante nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración oral.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica.

Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los ingredientes activos con los portadores o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntima los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, en caso necesario, conformando el producto.

5

Kits de la invención

La invención proporciona también kits para el tratamiento de un paciente con una enfermedad genética, comprendiendo dicho kit al menos una molécula antisentido envasada en un envase adecuado, junto con instrucciones para su uso.

10

En una realización preferida, los kits contendrán al menos una molécula antisentido. Los kits pueden contener también reactivos periféricos tales como tampones, estabilizadores, etc.

15

Los especialistas en la materia deben apreciar que las aplicaciones del método anterior tienen una amplia aplicación para identificar moléculas antisentido adecuadas para uso en el tratamiento de muchas otras enfermedades.

Ejemplos

20

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente la manera de usar la invención anteriormente descrita, así como para exponer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos no sirven en modo alguno para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino que en lugar de ello se presentan con fines ilustrativos.

25

30

Los métodos de clonación molecular, inmunología y química de proteínas que no se describen explícitamente en los siguientes ejemplos se han notificado en la bibliografía y son conocidos por los especialistas en la materia. Los textos genéricos que describen técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante dentro del alcance de la técnica incluyen, por ejemplo: Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989); Glover ed., "DNA Cloning: A Practical Approach", volúmenes I y II, MRL Press, Ltd., Oxford, RU (1985) y Ausubel F., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates/Wiley Intersciences, Nueva York (2002).

Determinación de la omisión de exón inducida en células musculares humanas

35

Los intentos por los inventores de desarrollar un enfoque racional en el diseño de moléculas antisentido no fueron completamente exitosos, ya que no parecía haber una tendencia consistente que pudiera aplicarse a todos los exones. Como tal, la identificación de los compuestos de moléculas antisentido más eficaces, y por lo tanto más terapéuticos, ha sido el resultado de estudios empíricos.

40

45

Estos estudios empíricos implicaron el uso de programas informáticos para identificar motivos potencialmente implicados en el proceso de corte y empalme. Se usaron también otros programas informáticos para identificar regiones del pre-ARNm que pueden no haber tenido una estructura secundaria extensa y por lo tanto eran sitios potenciales de asociación de moléculas antisentido. Ninguno de estos enfoques se probó completamente fiable en el diseño de oligonucleótidos antisentido para la inducción fiable y eficaz de omisión de exón.

50

Se seleccionaron para examen sitios de asociación en pre-ARNm de distrofina humana basándose inicialmente en los motivos o regiones conocidos o predichos implicados en el corte y empalme. Se diseñaron oligonucleótidos antisentido 2-O-Me para ser complementarios de las secuencias diana en investigación, y se sintetizaron en un sintetizador de ácidos nucleicos Expedite 8909. Tras la terminación de la síntesis, se escindieron los oligonucleótidos de la columna de soporte y se desprotegeron con hidróxido de amonio antes de desalar. Se monitorizó la calidad de la síntesis de oligonucleótidos mediante la intensidad de las señales de tritilo después de cada etapa de desprotección durante la síntesis, según se detectaba en el registro de síntesis. Se estimó la concentración de oligonucleótido antisentido midiendo la absorbancia de una alícuota diluida a 260 nm.

55

Se ensayó entonces en cantidades específicas de moléculas antisentido su capacidad de inducir la omisión de exón en un ensayo *in vitro* como se describe a continuación.

60

Brevemente, se prepararon cultivos de mioblastos primarios normales a partir de biopsias de músculo humano obtenidas después de consentimiento informado. Se propagaron las células y se dejaron diferenciar en miotubos usando técnicas de cultivo estándares. Se transfectaron entonces las células con los oligonucleótidos antisentido mediante el suministro de los oligonucleótidos a las células en forma de lipoplejos catiónicos, mezclas de moléculas antisentido o preparaciones liposómicas catiónicas.

65

Se dejaron crecer entonces las células durante otras 24 horas, después de lo cual se extrajo el ARN total y comenzó el análisis molecular. Se emprendió una amplificación por transcriptasa inversa (PCR-TI) para estudiar las regiones diana del pre-ARNm de distrofina o las redistribuciones exónicas inducidas.

ES 2 361 325 T3

Por ejemplo, en el ensayo de una molécula antisentido para inducir la omisión del exón 19, el ensayo de PCR-TI examinó varios exones para detectar la implicación de cualquier exón adyacente. Por ejemplo, cuando se induce la omisión del exón 19, se llevó a cabo la PCR-TI con cebadores que amplificaban los exones 17 y 21. Se llevaron a cabo también ampliaciones de productos aún mayores en esta zona (concretamente, los exones 13-26) para asegurar que había un sesgo de amplificación mínimo para el transcrito omitido inducido más corto. Los productos más cortos o de exón omitido tienden a amplificarse más eficazmente y pueden sesgar la estimación de transcrito normal e inducido.

Se estimaron los tamaños de los productos de la reacción de amplificación en un gel de agarosa y se compararon frente a patrones de tamaño apropiados. La confirmación de identidad final de estos productos se llevó a cabo mediante secuenciación de ADN directa para establecer que se han mantenido las conexiones de exón correctas o esperadas.

Una vez se ha inducido la omisión de exón eficaz con una molécula antisentido, pueden sintetizarse las moléculas antisentido superpuestas posteriores y evaluarse entonces en el ensayo como se describe anteriormente. La definición de molécula antisentido eficaz es aquella que induce una omisión de exón fuerte y mantenida a concentraciones de transfección del orden de 300 nM o menos.

Oligonucleótidos antisentido orientados al exón 51

Se prepararon oligonucleótidos antisentido orientados al exón 51 y se ensayó su capacidad de inducir la omisión de exón en células de músculo humano usando métodos similares a los descritos anteriormente.

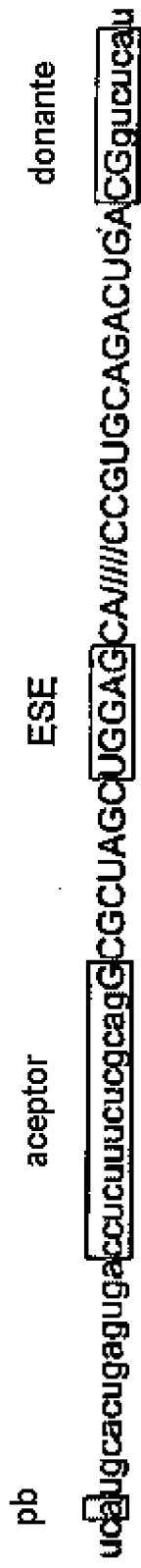
El oligonucleótido antisentido H51A(+66+90) [SEQ ID NO 180] mostró la mayor capacidad de inducir la omisión del exón 51. La Tabla 1 siguiente incluye moléculas antisentido ensayadas en un intervalo de concentración de 25, 50, 100, 300 y 600 nM. Estas moléculas antisentido mostraban una capacidad variable de inducir la omisión del exón 51. Los inductores más fuertes de la omisión de exón fueron los oligonucleótidos antisentido H51A(+61+90) [SEQ ID NO 179] y H51A(+66+95) [SEQ ID NO 181].

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir la omisión
H51A(-01+25)	ACC AGA GUA ACA GUC UGA GUA GGA GC	Omisión débil
H51D(+16-07)	CUC AUA CCU UCU GCU UGA UGA UC	Omisión a 300 nM
H51A(+111+134)	UUC UGU CCA AGC CCG GUU GAA AUC	Necesita reensayo
H51A(+61+90)	ACA UCA AGG AAG AUG GCA UUU CUA GUU UGG	Omisión muy fuerte
H51A(+66+90)	ACA UCA AGG AAG AUG GCA UUU CUA G	Omisión
H51A(+66+95)	CUC CAA CAU CAA GGA AGA UGG CAU UUC UAG	Omisión muy fuerte
H51D(+08-17)	AUC AUU UUU UCU CAU ACC UUC UGC U	Sin omisión
H51A/D(+08-17) y (-15+?)	AUC AUU UUU UCU CAU ACC UUC UGC UAG GAG CUA AAA	Sin omisión
H51A(+175+195)	CAG CCA CCA UCA CCC UCY GUG	Sin omisión
H51A(+199+220)	AUC AUC UCG UUG AUA UCC UCA A	Sin omisión

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido antisentido que se une al gen de distrofina humana induciendo la omisión de exón en el gen de distrofina, consistente en la secuencia de SEQ ID NO 181, opcionalmente en el que las bases de uracilo (U) son bases de timina (T).
- 10 2. Un oligonucleótido antisentido aislado de hasta 50 nucleótidos de longitud, en el que el oligonucleótido antisentido comprende el oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1.
- 15 3. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido comprende una cadena principal modificada o ligamientos internucleotídicos no naturales.
- 20 4. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido se liga químicamente con uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido antisentido.
- 25 5. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido no activa la ARNasa H.
- 30 6. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3, en el que los restos de azúcar de la cadena principal oligonucleotídica se reemplazan por restos no naturales.
- 35 7. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3, en el que la cadena principal modificada comprende morfolinos.
- 40 8. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en el que los ligamientos internucleotídicos de la cadena principal oligonucleotídica se reemplazan por ligamientos internucleotídicos no naturales.
- 45 9. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 8, en el que los ligamientos internucleotídicos no naturales son fosfatos modificados.
- 50 10. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 9, en el que los fosfatos modificados se seleccionan de metilfosfonatos, metilfosforotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforoamidatos.
- 55 11. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 10, en el que los fosfatos modificados se seleccionan de fosforoamidatos.
- 60 12. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 10, en el que los fosfatos modificados se seleccionan de fosforomorfolidatos.
- 65 13. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 10, en el que los fosfatos modificados se seleccionan de fosforopiperazidatos.
14. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en el que los restos de azúcar de la cadena principal oligonucleotídica se reemplazan por restos no naturales y los ligamientos internucleotídicos de la cadena principal oligonucleotídica se reemplazan por ligamientos internucleotídicos no naturales.
15. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que las bases de uracilo son bases de timina.
16. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 15, en el que el oligonucleótido antisentido se liga químicamente con uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido antisentido.
17. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 16, en el que el oligonucleótido antisentido se liga químicamente con una cadena de polietilenglicol.
18. Una composición que comprende un oligonucleótido antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y uno o más portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
19. Un oligonucleótido antisentido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, o una composición según la reivindicación 18, para uso en un método de tratamiento de distrofia muscular en un paciente.

FIGURA 1



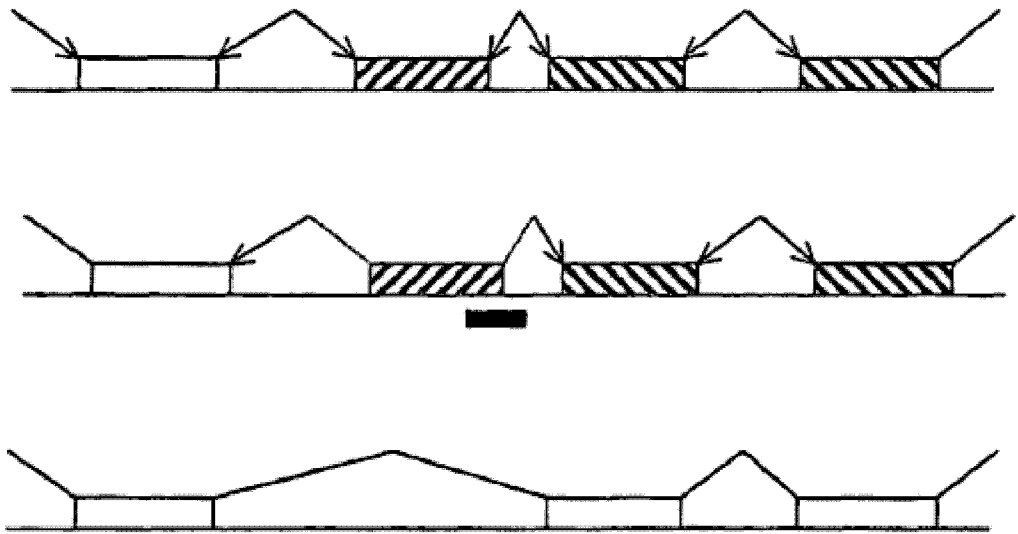


FIGURA 2

ES 2 361 325 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> The university of Western Australia	
5	<120> Oligonucleótidos anti-sentido para inducir omisión de exones y métodos de uso de los mismos.	
	<130> 111819	
	<160> 211	
	<170> PatentIn version 3.3	
10	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 1	
	gauagguggu aucaacaucu guaa	24
20	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
25	<213> humano	
	<400> 2	
30	gauagguggu aucaacaucu g	21
	<210> 3	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 3	
	gauagguggu aucaacaucu gaaag	25
45	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> humano	
50	<400> 4	
	ggugguauca acaucuguuaa	20
55	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
60	<213> humano	
	<400> 5	
65	gaucaacau cuguaagcac	20
	<210> 6	

ES 2 361 325 T3

	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 6	
	ugcauguucc agucguugug ugg	23
10	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 7	
20	cacuaaucca gucaaaauagg ucugg	25
	<210> 8	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 8	
30	auuuaccaac cuucaggauc gagua	25
	<210> 9	
35	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 9	
	ggccuaaaac acauacacau a	21
45	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 10	
55	cauuuuugac cuacaugugg	20
	<210> 11	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 11	
65	uuugaccuac auguggaaag	20
	<210> 12	

ES 2 361 325 T3

	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 12	
	uacauuuuug accuacaugu ggaaag	26
10	<210> 13	
	<211> 22	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 13	
20	auuuuugacc uacauggaa ag	22
	<210> 14	
	<211> 23	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 14	
30	uacgaguuga uugucggacc cag	23
	<210> 15	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 15	
	guggucuccu uaccuaugac ugugg	25
45	<210> 16	
	<211> 17	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 16	
55	ggucuccua ccuauga	17
	<210> 17	
	<211> 24	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 17	
65	ugucucagua aucuucuac cuau	24
	<210> 18	

ES 2 361 325 T3

	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 18	
	ucuuaccuau gacuauggau gaga	24
10	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 19	
20	gcaugaacuc uuguggauc	20
	<210> 20	
	<211> 20	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 20	
30	ccagguacu acuuacauua	20
	<210> 21	
35	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 21	
	aucguguguc acagcaucca g	21
45	<210> 22	
	<211> 30	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 22	
55	uguucagggc augaacucuu guggaucuu	30
	<210> 23	
	<211> 31	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 23	
65	uaggagggc cucccauccu guaggucacu g	31
	<210> 24	

ES 2 361 325 T3

	<p><211> 31</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
5	<p><400> 24</p>		
	<p style="padding-left: 40px;">aggucuagga ggcgccuccc auccuguagg u</p>		31
10	<p><210> 25</p>		
	<p><211> 25</p>		
	<p><212> DNA</p>		
15	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 25</p>		
20	<p style="padding-left: 40px;">gcgccuccca uccuguaggu cacug</p>		25
	<p><210> 26</p>		
	<p><211> 26</p>		
25	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 26</p>		
30	<p style="padding-left: 40px;">cuucgaggag gucuaggagg cgccuc</p>		26
	<p><210> 27</p>		
35	<p><211> 21</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
40	<p><400> 27</p>		
	<p style="padding-left: 40px;">cucccauccu guaggucacu g</p>		21
45	<p><210> 28</p>		
	<p><211> 22</p>		
	<p><212> DNA</p>		
50	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 28</p>		
55	<p style="padding-left: 40px;">uaccaguuuu ugcccuguca gg</p>		22
	<p><210> 29</p>		
	<p><211> 26</p>		
60	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 29</p>		
65	<p style="padding-left: 40px;">ucaauaugcu gcuucccaaa cugaaa</p>		26
	<p><210> 30</p>		

ES 2 361 325 T3

	<p><211> 25</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
5	<p><400> 30</p>		
	<p style="padding-left: 40px;">cuaggaggcg ccucccaucc uguag</p>		25
10	<p><210> 31</p>		
	<p><211> 31</p>		
	<p><212> DNA</p>		
15	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 31</p>		
20	<p style="padding-left: 40px;">uuaugauuuc caucuacgau gucaguacuu c</p>		31
	<p><210> 32</p>		
	<p><211> 31</p>		
25	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 32</p>		
30	<p style="padding-left: 40px;">cuuaccugcc aguggaggau uauauuccaa a</p>		31
	<p><210> 33</p>		
35	<p><211> 25</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
40	<p><400> 33</p>		
	<p style="padding-left: 40px;">caucaggauu cuuaccugcc agugg</p>		25
45	<p><210> 34</p>		
	<p><211> 25</p>		
	<p><212> DNA</p>		
50	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 34</p>		
55	<p style="padding-left: 40px;">cgaugucagu acuuccaaua uucac</p>		25
	<p><210> 35</p>		
	<p><211> 18</p>		
60	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 35</p>		
65	<p style="padding-left: 40px;">accaucauc aggauucu</p>		18
	<p><210> 36</p>		

ES 2 361 325 T3

	<p><211> 18</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
5	<p><400> 36</p>		
	<p style="padding-left: 40px;">accugccagu ggaggauu</p>		18
10	<p><210> 37</p>		
	<p><211> 27</p>		
	<p><212> DNA</p>		
15	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 37</p>		
20	<p style="padding-left: 40px;">ccaauuuca cuaaaucaac cuguuaa</p>		27
	<p><210> 38</p>		
	<p><211> 30</p>		
25	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 38</p>		
30	<p style="padding-left: 40px;">caggauucuu accugccagu ggaggauuau</p>		30
	<p><210> 39</p>		
35	<p><211> 31</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
40	<p><400> 39</p>		
	<p style="padding-left: 40px;">acgaugucag uacuuccaau auucacuaaa u</p>		31
45	<p><210> 40</p>		
	<p><211> 31</p>		
	<p><212> DNA</p>		
50	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 40</p>		
55	<p style="padding-left: 40px;">auuuccaucu acgaugucag uacuuccaau a</p>		31
	<p><210> 41</p>		
	<p><211> 21</p>		
60	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 41</p>		
65	<p style="padding-left: 40px;">caggagcuuc caaavgcugc a</p>		21
	<p><210> 42</p>		

ES 2 361 325 T3

	<211> 29	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 42	
	cuugucuuca ggagcuucca aaugcugca	29
10	<210> 43	
	<211> 22	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 43	
20	uccucagcag aaagaagcca cg	22
	<210> 44	
	<211> 20	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 44	
30	uuagaaaucu cuccuugugc	20
	<210> 45	
35	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 45	
	uaaaauugggu guuacacaau	20
45	<210> 46	
	<211> 24	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 46	
55	cccugaggca uuccaucuu gaau	24
	<210> 47	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 47	
65	aggacuuacu ugcuuuguuu	20
	<210> 48	

ES 2 361 325 T3

	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 48	
	cuugaauua ggagaucau cug	23
10	<210> 49	
	<211> 23	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 49	
20	caucuucuga uaauuuuccu guu	23
	<210> 50	
	<211> 24	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 50	
30	ucuucuguuu uuguuagcca guca	24
	<210> 51	
35	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 51	
	ucuauguaaa cugaaaauu	20
45	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 52	
55	uucuggagau ccauuaaaac	20
	<210> 53	
	<211> 24	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 53	
65	cagcaguugc gugaucucca cuag	24
	<210> 54	

ES 2 361 325 T3

	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 54	
	uucaucaacu accaccacca u	21
10	<210> 55	
	<211> 25	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 55	
20	cuaagcaaaa uaaucugacc uaaag	25
	<210> 56	
	<211> 28	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 56	
30	cuuguaaaaag aaccagagg ucuucugu	28
	<210> 57	
35	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 57	
	caucuacaga uguuugccca uc	22
45	<210> 58	
	<211> 23	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 58	
55	gaaggauguc uuguaaaaga acc	23
	<210> 59	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 59	
65	accuguucuu caguaagacg	20
	<210> 60	

ES 2 361 325 T3

	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 60	
	caugacacac cuguucuca guaa	24
10	<210> 61	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 61	
20	cauuugagaa ggaugucuug	20
	<210> 62	
	<211> 24	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 62	
30	aucucccaau accuggagaa gaga	24
	<210> 63	
35	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 63	
	gccaugcacu aaaaaggcac ugcaagacau u	31
45	<210> 64	
	<211> 24	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 64	
55	ucuuuaaagc caguugugug aauc	24
	<210> 65	
	<211> 21	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 65	
65	uuucugaaag ccaugcacua a	21
	<210> 66	

ES 2 361 325 T3

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 66	
	guacauacgg ccaguuuuug aagac	25
10	<210> 67	
	<211> 31	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 67	
20	cuagauccgc uuuuuuuuacc uguuuuuu a	31
	<210> 68	
	<211> 31	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 68	
30	ucuuuuuag auccgcuuuu aaaaccuguu a	31
	<210> 69	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 69	
	cuagauccgc uuuuuuuuacc uguua	25
45	<210> 70	
	<211> 23	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 70	
55	ccgucuucug ggucacugac uua	23
	<210> 71	
	<211> 26	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 71	
65	cuagauccgc uuuuuuuuacc uguuaa	26
	<210> 72	

ES 2 361 325 T3

	<p><211> 20</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
5	<p><400> 72</p>		
	<p style="padding-left: 40px;">ccgcuuuuaa aaccguuuaa</p>		20
10	<p><210> 73</p>		
	<p><211> 26</p>		
	<p><212> DNA</p>		
15	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 73</p>		
20	<p style="padding-left: 40px;">uggauugcuu uuucuuuucu agaucc</p>		26
	<p><210> 74</p>		
	<p><211> 25</p>		
25	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 74</p>		
30	<p style="padding-left: 40px;">caugcuuccg ucuucugggu cacug</p>		25
	<p><210> 75</p>		
35	<p><211> 23</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
40	<p><400> 75</p>		
	<p style="padding-left: 40px;">gaucuuguuu gagugauac agu</p>		23
45	<p><210> 76</p>		
	<p><211> 22</p>		
	<p><212> DNA</p>		
50	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 76</p>		
55	<p style="padding-left: 40px;">guuauccagc caugcuuccg uc</p>		22
	<p><210> 77</p>		
	<p><211> 25</p>		
60	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> humano</p>		
	<p><400> 77</p>		
65	<p style="padding-left: 40px;">ugauaaauugg uaucacuaac cugug</p>		25
	<p><210> 78</p>		

ES 2 361 325 T3

	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 78	
	guaucacuaa ccugugcugu ac	22
10	<210> 79	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 79	
20	cagcaguagu ugucaucugc	20
	<210> 80	
	<211> 31	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 80	
30	gccugagcug aucugcuggc aucuugcagu u	31
	<210> 81	
35	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 81	
	cuggcagaau ucgauccacc ggcuguuc	28
45	<210> 82	
	<211> 22	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 82	
55	cagcaguagu ugucaucugc uc	22
	<210> 83	
	<211> 19	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 83	
65	ugauggggug guggguugg	19
	<210> 84	

ES 2 361 325 T3

	<code><211> 25</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
5	<code><400> 84</code>		
	<code>aucugcauu acaccucua gaaag</code>		25
10	<code><210> 85</code>		
	<code><211> 24</code>		
	<code><212> DNA</code>		
15	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 85</code>		
20	<code>ccggcuguuc aguuguucug aggc</code>		24
	<code><210> 86</code>		
	<code><211> 28</code>		
25	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 86</code>		
30	<code>aucugcauu acaccucua gaaagaaa</code>		28
	<code><210> 87</code>		
35	<code><211> 28</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
40	<code><400> 87</code>		
	<code>gaaggagaag agauucuac cuuacaaa</code>		28
45	<code><210> 88</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
50	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 88</code>		
55	<code>auucgaucca ccggcuguuc</code>		20
	<code><210> 89</code>		
	<code><211> 19</code>		
60	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 89</code>		
65	<code>cugcuggcau cuugcaguu</code>		19
	<code><210> 90</code>		

ES 2 361 325 T3

	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 90	
	gccgguugac uucauccugu gc	22
10	<210> 91	
	<211> 22	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 91	
20	cugcauccag gaacaugggu cc	22
	<210> 92	
	<211> 23	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 92	
30	gucugcaucc aggaacaugg guc	23
	<210> 93	
35	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 93	
	guugaagauc ugauagccgg uuga	24
45	<210> 94	
	<211> 24	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 94	
55	uacuuacugu cuguagcucu uucu	24
	<210> 95	
	<211> 24	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 95	
65	cacucauggu cuccugauag cgca	24
	<210> 96	

ES 2 361 325 T3

	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 96	
	cugcaauucc ccgagucucu gc	22
10	<210> 97	
	<211> 23	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 97	
20	acugcuggac ccauguccug aug	23
	<210> 98	
	<211> 21	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 98	
30	cuaaguugag guauggagag u	21
	<210> 99	
35	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 99	
	uauucacaga ccugcaauuc ccc	23
45	<210> 100	
	<211> 26	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 100	
	acaguggugc ugagauagua uaggcc	26
55	<210> 101	
	<211> 22	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 101	
65	uaggccacuu uguugcucuu gc	22
	<210> 102	

ES 2 361 325 T3

	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 102	
	uucagagggc gcuuucuuc	19
10	<210> 103	
	<211> 23	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 103	
20	gggcaggcca uuccuccuuc aga	23
	<210> 104	
	<211> 24	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 104	
30	ucuucagggg uuguauuguga uucu	24
	<210> 105	
35	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 105	
	cugggcugaa uugucugaau aucacug	27
45	<210> 106	
	<211> 26	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 106	
55	cuguuggcac augugaucc acugag	26
	<210> 107	
	<211> 24	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 107	
65	gucuauaccu guuggcacau guga	24
	<210> 108	

ES 2 361 325 T3

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 108	
	ugcuuucugu aaUCAUCUG gaguu	25
10	<210> 109	
	<211> 26	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 109	
20	ccuccuuucu ggCAUAGACC uccac	26
	<210> 110	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 110	
30	ugugucaucc auUCGUGCAU cucug	25
	<210> 111	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 111	
	uuAAGGCCUC uUGUGCUACA ggugg	25
45	<210> 112	
	<211> 23	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 112	
55	gggccucuuc uuuAGCUCUC uga	23
	<210> 113	
	<211> 22	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 113	
65	gacuuccaaa gUCUUGCAUU uc	22
	<210> 114	

ES 2 361 325 T3

	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 114	
	gccaacaugc ccaaacuucc uaag	24
10	<210> 115	
	<211> 26	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 115	
20	cagagauuuc cucagcuccg ccagga	26
	<210> 116	
	<211> 21	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 116	
30	cuuaraucua gcaccucaga g	21
	<210> 117	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 117	
	uccgccaucu guuagggucc gugcc	25
45	<210> 118	
	<211> 25	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 118	
55	auuuggguua uccucugaau gucgc	25
	<210> 119	
	<211> 22	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 119	
65	cauaccucuu cauguaguuc uc	22
	<210> 120	

ES 2 361 325 T3

	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 120	
	cauuugagcu gcguccaccu ugucgucugu g	31
10	<210> 121	
	<211> 26	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 121	
20	uccugggcag acuggaugcu cuguuc	26
	<210> 122	
	<211> 23	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 122	
30	uugccugggc uuccugaggc auu	23
	<210> 123	
35	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 123	
	uucugaaaau acauauaccu gugc	24
45	<210> 124	
	<211> 25	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 124	
55	uaguuuucuga aauaacauau accug	25
	<210> 125	
	<211> 21	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 125	
65	gacuugucua aucagauugg a	21
	<210> 126	

ES 2 361 325 T3

	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 126	
	guuucugaaa uaacauauac cugu	24
10	<210> 127	
	<211> 20	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 127	
20	caccagaaau acauaccaca	20
	<210> 128	
	<211> 20	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 128	
30	caaugauuuu gcugugacug	20
	<210> 129	
35	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 129	
	cgaaacuuca uggagacauc uug	23
45	<210> 130	
	<211> 25	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 130	
55	cuuguagacg cugcucaaaa uggc	25
	<210> 131	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 131	
65	caugcacaca ccuuugcucc	20
	<210> 132	

ES 2 361 325 T3

	<p><211> 24</p>	
	<p><212> DNA</p>	
	<p><213> humano</p>	
5	<p><400> 132</p>	
	<p style="padding-left: 40px;">ucuguacaau cugacgucca gucu</p>	24
10	<p><210> 133</p>	
	<p><211> 27</p>	
	<p><212> DNA</p>	
15	<p><213> humano</p>	
	<p><400> 133</p>	
20	<p style="padding-left: 40px;">gucuuuaucu ccauuuccac uucagac</p>	27
	<p><210> 134</p>	
	<p><211> 25</p>	
25	<p><212> DNA</p>	
	<p><213> humano</p>	
	<p><400> 134</p>	
30	<p style="padding-left: 40px;">ccgucugcuu uuucuguaca aucug</p>	25
	<p><210> 135</p>	
35	<p><211> 22</p>	
	<p><212> DNA</p>	
	<p><213> humano</p>	
40	<p><400> 135</p>	
	<p style="padding-left: 40px;">uccauaucug uagcugccag cc</p>	22
45	<p><210> 136</p>	
	<p><211> 23</p>	
	<p><212> DNA</p>	
50	<p><213> humano</p>	
	<p><400> 136</p>	
	<p style="padding-left: 40px;">ccaggaacu ucagaaucua aau</p>	23
55	<p><210> 137</p>	
	<p><211> 30</p>	
60	<p><212> DNA</p>	
	<p><213> humano</p>	
	<p><400> 137</p>	
65	<p style="padding-left: 40px;">uuucuguuac cugaaaagaa uuauaaugaa</p>	30
	<p><210> 138</p>	

ES 2 361 325 T3

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 138	
	caucuuuuc cuuucgcauc uuacg	25
10	<210> 139	
	<211> 26	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 139	
20	ugaucucuuu gucaaucca uaucug	26
	<210> 140	
	<211> 27	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 140	
30	uucagugaua uagguuuuac cuuuccc	27
	<210> 141	
35	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 141	
	cuguagcugc cagccauucu gucaag	26
45	<210> 142	
	<211> 21	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 142	
55	ucuucugcuc gggaggugac a	21
	<210> 143	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 143	
65	ccaguuacua uucagaagac	20
	<210> 144	

ES 2 361 325 T3

	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
5	<code><400> 144</code>		
	<code>ucuucaggug caccuucugu</code>		20
10	<code><210> 145</code>		
	<code><211> 25</code>		
	<code><212> DNA</code>		
15	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 145</code>		
20	<code>ugugaugugg uccacauucu gguca</code>		25
	<code><210> 146</code>		
	<code><211> 20</code>		
25	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 146</code>		
30	<code>ccauguguuu cugguauucc</code>		20
	<code><210> 147</code>		
35	<code><211> 25</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
40	<code><400> 147</code>		
	<code>cguguagagu ccacuuugg gcgua</code>		25
45	<code><210> 148</code>		
	<code><211> 24</code>		
	<code><212> DNA</code>		
50	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 148</code>		
55	<code>uacuaauuuc cugcaguggu cacc</code>		24
	<code><210> 149</code>		
	<code><211> 24</code>		
60	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 149</code>		
65	<code>uucuguguga aauggcugca aauc</code>		24
	<code><210> 150</code>		

ES 2 361 325 T3

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 150	
	ccucaaagg aauggaggcc	20
10	<210> 151	
	<211> 25	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 151	
20	ugcugaauuu cagccuccag ugguu	25
	<210> 152	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 152	
30	ugaagucuuc cucuuucaga uucac	25
	<210> 153	
35	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 153	
	cuggcuuucu cucaucugug auuc	24
45	<210> 154	
	<211> 20	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 154	
55	guuguaaguu gucuccuuu	20
	<210> 155	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 155	
65	uugucuguaa cagcugugu	20
	<210> 156	

ES 2 361 325 T3

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 156	
	gcucuaauac cuugagagca	20
10	<210> 157	
	<211> 22	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 157	
20	cuuugagacc ucaaauccug uu	22
	<210> 158	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 158	
30	cuuuuuuuuc cuuucaucuc ugggc	25
	<210> 159	
35	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 159	
	aucguuuuu cacggacagu gugcugg	27
45	<210> 160	
	<211> 24	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 160	
55	gggcuuguga gacaugagug auuu	24
	<210> 161	
	<211> 22	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 161	
65	accuucagag gacuccuuu gc	22
	<210> 162	

ES 2 361 325 T3

	<code><211> 25</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
5	<code><400> 162</code>		
	<code>uauguguuac cuacccuugu cgguc</code>		25
10	<code><210> 163</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
15	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 163</code>		
20	<code>ggagagagcu uccuguagcu</code>		20
	<code><210> 164</code>		
	<code><211> 23</code>		
25	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 164</code>		
30	<code>ucacccuuuc cacagcgguu gca</code>		23
	<code><210> 165</code>		
35	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
40	<code><400> 165</code>		
	<code>uuugugucuu ucugagaaac</code>		20
45	<code><210> 166</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
50	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 166</code>		
55	<code>aaagacuuac cuuaagauac</code>		20
	<code><210> 167</code>		
	<code><211> 20</code>		
60	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 167</code>		
65	<code>aucugucaaa ucgccugcag</code>		20
	<code><210> 168</code>		

ES 2 361 325 T3

	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
5	<code><400> 168</code>		
	<code>uuaccuugac uugcucaagc</code>		20
10	<code><210> 169</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> DNA</code>		
15	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 169</code>		
20	<code>uccagguuca agugggauac</code>		20
	<code><210> 170</code>		
	<code><211> 25</code>		
25	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 170</code>		
30	<code>gcucuucugg gcuuauuggga gcacu</code>		25
	<code><210> 171</code>		
35	<code><211> 27</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
40	<code><400> 171</code>		
	<code>accuuuaucc acuggagauu ugucugc</code>		27
45	<code><210> 172</code>		
	<code><211> 21</code>		
	<code><212> DNA</code>		
50	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 172</code>		
55	<code>uuccaccagu aacugaaaca g</code>		21
	<code><210> 173</code>		
	<code><211> 29</code>		
60	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> humano</code>		
	<code><400> 173</code>		
65	<code>ccacucagag cucagaucuu cuaacuucc</code>		29
	<code><210> 174</code>		

ES 2 361 325 T3

	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 174	
	cuucaacuca gagcucagau cuucuaa	27
10	<210> 175	
	<211> 25	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 175	
20	gggauccagu auacuuacag gcucc	25
	<210> 176	
	<211> 26	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 176	
30	accagaguaa cagucugagu aggagc	26
	<210> 177	
35	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 177	
	cucauaccuu cugcuugaug auc	23
45	<210> 178	
	<211> 24	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 178	
55	uucuguccaa gcccguuga aauc	24
	<210> 179	
	<211> 25	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 179	
65	acaucaagga ggauggcauu ucuag	25
	<210> 180	

ES 2 361 325 T3

	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 180	
	acaucaagga agauggcauu ucuag	25
10	<210> 181	
	<211> 30	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 181	
20	cuccaacauc aaggaagaug gcuuuucuag	30
	<210> 182	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 182	
30	aucauuuuuu cucauaccuu cugcu	25
	<210> 183	
35	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 183	
	aucauuuuuu cucauaccuu cugcuaggag cuaaaa	36
45	<210> 184	
	<211> 21	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 184	
55	caccaccau caccucugu g	21
	<210> 185	
	<211> 22	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 185	
65	aucaucucgu ugauauccuc aa	22
	<210> 186	

ES 2 361 325 T3

	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 186	
	uccugcauug uugccuguaa g	21
10	<210> 187	
	<211> 30	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 187	
20	uccaacuggg gacgccucug uuccaaaucc	30
	<210> 188	
	<211> 21	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 188	
30	acuggggacg ccucuguucc a	21
	<210> 189	
35	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 189	
	ccguaaugau uguucuagcc	20
45	<210> 190	
	<211> 20	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 190	
55	uguuaaaaaa cuuacuucga	20
	<210> 191	
	<211> 31	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 191	
65	cauucacug uugccuccgg uucugaaggu g	31
	<210> 192	

ES 2 361 325 T3

	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 192	
	cuguugccuc cgguucugaa ggug	24
10	<210> 193	
	<211> 25	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 193	
20	cauUCAACUG uugccuccgg uucug	25
	<210> 194	
	<211> 21	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 194	
30	uacuaaccuu gguuucugug a	21
	<210> 195	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 195	
	cugaaggugu ucuuguacuu caucc	25
45	<210> 196	
	<211> 27	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 196	
55	uguauaggga cccuccuucc augacuc	27
	<210> 197	
	<211> 25	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 197	
65	cuaaccuugg uuucugugau uuucu	25
	<210> 198	

ES 2 361 325 T3

	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 198	
	gguaucuuug auacuaaccu ugguuuc	27
10	<210> 199	
	<211> 22	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 199	
20	auucuuuca cuagaauaaa ag	22
	<210> 200	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 200	
30	gauucugaau ucuuuaacu agaau	25
	<210> 201	
35	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 201	
	auccacuga uucugaauc	20
45	<210> 202	
	<211> 22	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 202	
55	uuggcucugg ccuguccuaa ga	22
	<210> 203	
	<211> 30	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 203	
65	cucuuuucca gguucaagug ggauacuagc	30
	<210> 204	

ES 2 361 325 T3

	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> humano	
5	<400> 204	
	caagcuuuuc uuuuaguugc ugcucuuuuc c	31
10	<210> 205	
	<211> 30	
	<212> DNA	
15	<213> humano	
	<400> 205	
20	uauucuuuug uucucuagc cuggagaaag	30
	<210> 206	
	<211> 28	
25	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 206	
30	cugcuuccuc caaccuauaa acaaaauuc	28
	<210> 207	
35	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> humano	
40	<400> 207	
	ccaaugccau ccuggaguuc cuguuaa	26
45	<210> 208	
	<211> 20	
	<212> DNA	
50	<213> humano	
	<400> 208	
55	uccuguagaa uacuggcauc	20
	<210> 209	
	<211> 27	
60	<212> DNA	
	<213> humano	
	<400> 209	
65	ugcagaccuc cugccaccgc agauuca	27
	<210> 210	

ES 2 361 325 T3

<211> 20

<212> DNA

<213> humano

5

<400> 210

cuaccucuuu uuucugucug

20

10

<210> 211

<211> 20

<212> DNA

15

<213> humano

<400> 211

20

uguuuuugag gauugcugaa

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65