

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 836**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2010 PCT/NL2010/050230**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.10.2010 WO10123369**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010 E 10718717 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2421971**

54 Título: **Oligonucleótido que comprende una inosina para tratar la DMD**

30 Prioridad:

24.04.2009 EP 09158731

24.04.2009 US 172506 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2016

73 Titular/es:

BIOMARIN TECHNOLOGIES B.V. (100.0%)

J.H. Oortweg 21

2333 CH Leiden, NL

72 Inventor/es:

VAN DEUTEKOM, JUDITH CHRISTINA

THEODORA;

DE KIMPE, JOSEPHUS JOHANNES y

PLATENBURG, GERARDUS JOHANNES

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 593 836 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

Oligonucleótido que comprende una inosina para tratar la DMD.

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a los campos de la biología molecular y la medicina.

Antecedentes de la invención

10 [0002] Un trastorno muscular es una enfermedad que normalmente tiene un impacto significativo en la vida de un individuo.

Un trastorno muscular puede tener o bien una causa genética o bien una causa no genética. Un grupo importante de enfermedades musculares con causa genética son la distrofia muscular de Becker (BMD) y la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Estos trastornos son provocados por defectos en un gen para una proteína muscular.

[0003] La distrofia muscular de Becker y la distrofia muscular de Duchenne son distrofias musculares genéticas con una incidencia relativamente alta.

20 En las distrofias musculares tanto de Duchenne como de Becker, la proteína muscular distrofina se ve afectada. En la distrofia de Duchenne, la distrofina está ausente, mientras que en la de Becker hay algo de distrofina pero su producción muy a menudo no es suficiente y/o la distrofina presente se forma de manera anormal. Ambas enfermedades se asocian con una herencia recesiva ligada al cromosoma X. La DMD resulta de una mutación de desplazamiento del marco de lectura en el gen DMD. El desplazamiento del marco de lectura en la transcripción del gen DMD (ARNm) tiene como resultado la producción de una proteína distrofina no funcional truncada, dando como resultado una atrofia y debilidad muscular progresivas. La BMD ocurre cuando una mutación no causa un desplazamiento de marco en la transcripción del DMD (ARNm).

Como en la BMD existe presencia de algo de distrofina parcialmente o en gran medida funcional, a diferencia de la DMD donde la distrofina está ausente, la BMD tiene síntomas generalmente menos graves que la DMD.

30 La aparición de la DMD es anterior que la de la BMD. La DMD normalmente se manifiesta en la infancia temprana, y la BMD en los adolescentes o en la edad adulta temprana. La progresión de la BMD es más lenta y menos previsible que la de la DMD. Los pacientes con BMD pueden sobrevivir hasta entre la edad adulta intermedia y tardía. Los pacientes con DMD raramente sobreviven más allá de la treintena.

[0004] La distrofina desempeña una importante función estructural en la fibra muscular, conectando la matriz extracelular y el citoesqueleto.

La región N-terminal enlaza la actina, mientras que el extremo C-terminal forma parte del complejo distrofina-glicoproteína (DGC), que abarca el sarcolema.

En ausencia de distrofina, la tensión mecánica lleva a roturas del sarcolema, lo que causa un flujo descontrolado de calcio en la fibra muscular interior, activando así las proteasas activadas por calcio y necrosis de la fibra.

40 [0005] Para la mayoría de distrofias musculares genéticas, actualmente no hay disponible ningún tratamiento clínicamente aplicable y eficaz.

Actualmente se exploran las técnicas de salto de exón para combatir las distrofias musculares genéticas.

45 Recientemente se han reportado resultados prometedores, por nosotros y por otros, en una terapia genética dirigida a la restauración del marco de lectura del pre-ARNm de distrofina en células de ratón mdx, de perro golden retriever con distrofia muscular (referencia 59) y patients de DMD ¹⁻¹¹.

WO 2006/000057 describe una lista de oligonucleótidos antisentido dirigidos a diferentes exones del gen DMD con un grado variable de eficiencia de salto de exón.

50 Mediante el salto previsto de un exón específico, un fenotipo de DMD (distrofina carente) se convierte en un fenotipo de BMD más suave (distrofina parcialmente o en gran medida funcional).

El salto de un exón es preferiblemente inducido por la unión de oligorribonucleótidos antisentido (AON) dirigidos a uno o ambos de los sitios de empalme, o secuencias internas de exón.

Ya que un exón sólo se incluye en el ARNm cuando los sitios de empalme son reconocidos por el complejo espliceosoma, los sitios de empalme se han considerado objetivos obvios para los AON.

55 Más preferiblemente, se usan uno o más AON que son específicos para al menos parte de una o varias secuencias exónicas implicadas en el empalme correcto del exón.

Al utilizar AON internos de exón específicos para una secuencia de exón 46, previamente fuimos capaces de modular el modelo de empalme en miotubos cultivados de dos pacientes de DMD diferentes con una delección del exón 45 ¹¹.

60 Después del tratamiento con AON, el exón 46 fue saltado, lo que resultó en un marco de lectura restaurado y en la inducción de síntesis de distrofina en al menos 75% de las células.

Recientemente hemos demostrado que el salto de exón también puede ser eficazmente inducido en células musculares de control humanas y de paciente para 39 exones de DMD diferentes usando AON internos al exón ^{1,2, 11-15}.

65 [0006] Por lo tanto, las técnicas de salto de exón aplicadas en el gen de distrofina suponen la generación de proteína

distrofina al menos parcialmente funcional - aunque más corta - en pacientes de DMD.

Ya que la DMD está provocada por una proteína distrofina disfuncional, sería de esperar que los síntomas de la DMD se vean lo suficientemente aliviados una vez que se ha proporcionado a un paciente de DMD proteína distrofina funcional.

5 Sin embargo, la presente invención proporciona el conocimiento de que, aunque las técnicas de salto de exón son capaces de inducir la síntesis de distrofina, el oligonucleótido usado para la técnica de salto de exón se puede mejorar más mediante la incorporación de una inosina y/o un nucleótido con una base capaz de formar un par de base de balanceo en dicho oligonucleótido.

10 WO 2001/083503 describe oligonucleótidos que tienen inosina para sustituciones de guanina y se refiere a un método para el marcaje de oligonucleótidos que podrían ser usados en series de diagnóstico.

WO 2005/115479 divulga inosina para sustituciones de guanina para reducir la agregación de conjugados PMO-péptido ricos en G.

15 Descripción de la invención

Oligonucleótido

[0007] En un primer aspecto de la invención, se proporciona un oligonucleótido antisentido que comprende al menos una inosina, donde el oligonucleótido comprende una secuencia que se dirige a al menos parte de una parte de exón de pre-ARNm de distrofina que es una extensión contigua que comprende al menos 13 nucleótidos y donde el oligonucleótido antisentido es capaz de realizar un salto de exón.

20 En otro aspecto, se proporciona un oligonucleótido según la divulgación que incluye una inosina y/o un nucleótido con una base capaz de formar un par de bases de balanceo o un equivalente funcional del mismo, donde el oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, comprende una secuencia que es complementaria por lo menos de parte de un exón de pre-ARNm de distrofina o al menos de parte de una región sin exón de un pre-ARNm de distrofina, dicha parte siendo una extensión contigua que comprende al menos 8 nucleótidos.

25 El uso de una inosina y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases de balanceo en un oligonucleótido de la invención es muy atractivo, como se explica a continuación.

30 La inosina, por ejemplo, es una base modificada conocida que se puede aparear con tres bases: uracilo, adenina, y citosina.

La inosina es un nucleósido que se forma cuando la hipoxantina se fija a un anillo de ribosa (también conocido como una ribofuranosa) a través de un enlace β -N⁹-glucosídico.

La inosina se encuentra comúnmente en el ARNt y es esencial para la traducción apropiada del código genético en los pares de bases de balanceo.

35 Un par de bases de balanceo es un par G-U e I-U / I-A / I-C fundamental en la estructura secundaria del ARN.

Su estabilidad termodinámica es comparable a la del par de bases Watson-Crick.

Los pares de bases de balanceo son fundamentales para la traducción apropiada del código genético.

El código genético compensa las disparidades en el número de aminoácidos (20) para codones tripletes (64) usando pares de bases modificados en la primera base del anticodón.

40 De forma similar, al diseñar cebadores para la reacción en cadena de la polimerasa, la inosina es útil porque se aparear indiscriminadamente con adenina, timina, o citosina.

Una primera ventaja del uso de tal base permite diseñar un cebador que abarca un polimorfismo de nucleótido único (SNP), sin preocuparse de que el polimorfismo interrumpa la eficiencia de reconocimiento del cebador.

45 Por lo tanto, en la invención, el uso de tal base permite diseñar un oligonucleótido que se puede utilizar para un individuo con un SNP en la extensión de pre-ARNm de distrofina al que se dirige un oligonucleótido de la invención.

Una segunda ventaja del uso de una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo en un oligonucleótido de la invención es cuando dicho oligonucleótido normalmente contendría una CpG si un hubiera sido diseñado como complementario de por lo menos parte de un exón de pre-ARNm de distrofina o al menos parte de una región sin exón de un pre-ARNm de distrofina, dicha parte siendo una extensión contigua que comprende al menos 13 nucleótidos.

50 La presencia de una CpG en un oligonucleótido está normalmente asociada a una inmunogenicidad aumentada de dicho oligonucleótido (referencia 60).

Esta inmunogenicidad aumentada no es deseable, ya que puede inducir la descomposición de fibras musculares.

55 Se espera que el reemplazo de una, dos o más CpG por la inosina correspondiente y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo en dicho oligonucleótido proporcione un oligonucleótido con un nivel disminuido y/o aceptable de inmunogenicidad.

La inmunogenicidad se puede evaluar en un modelo animal mediante la evaluación de la presencia de células CD4⁺ y/o CD8⁺ y/o infiltrantes de mononucleocitos inflamatorios en la biopsia muscular de dicho animal.

60 La inmunogenicidad también se puede evaluar en la sangre de un animal o de un ser humano tratado con un oligonucleótido de la invención mediante la detección de la presencia de un anticuerpo de neutralización y/o un anticuerpo que reconoce dicho oligonucleótido utilizando un inmunoensayo estándar conocido por la persona experta.

Un aumento en la inmunogenicidad corresponde preferiblemente a un aumento detectable de al menos uno de estos tipos celulares por comparación con la cantidad de cada tipo celular en una biopsia de músculo correspondiente de un animal antes del tratamiento o tratado con un oligonucleótido correspondiente con al menos una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo.

Alternativamente, un aumento en la inmunogenicidad se puede evaluar mediante la detección de la presencia o de una cantidad en aumento de un anticuerpo de neutralización o de un anticuerpo que reconoce dicho oligonucleótido utilizando un inmunoensayo estándar.

Una reducción en la inmunogenicidad corresponde preferiblemente a una reducción detectable de al menos uno de estos tipos celulares por comparación a la cantidad de tipo de célula correspondiente en una biopsia de músculo correspondiente de un animal antes del tratamiento o tratado con un oligonucleótido correspondiente sin ninguna inosina y/o base capaz de formar un par de bases de balanceo.

Alternativamente, una reducción en la inmunogenicidad se puede evaluar por la ausencia o una cantidad decreciente de dicho compuesto y/o anticuerpos de neutralización utilizando un inmunoensayo estándar.

[0008] Una tercera ventaja del uso de una inosina y/o de una base capaz de formar un par de bases de balanceo en un oligonucleótido de la invención es la de evitar o reducir una multimerización o agregación potencial de oligonucleótidos.

Por ejemplo, se sabe que un oligonucleótido que comprende un motivo G-cuádruple tiende a formar un cuádruplex, un multímero o agregado formado por el apareamiento de bases Hoogsteen de cuatro oligonucleótidos monocatenarios (referencia 61), que por supuesto no es deseado: como resultado, se espera que la eficiencia del oligonucleótido disminuya.

La multimerización o agregación es preferiblemente evaluada por técnicas de electroforesis estándar con gel no desnaturante de poliacrilamida conocidas por la persona experta.

En una forma de realización preferida, menos del 20% o 15%, 10%, 7%, 5% o menos de una cantidad total de un oligonucleótido de la invención tiene la capacidad para multimerizar o agregar, evaluado utilizando el ensayo mencionado anteriormente.

[0009] Una cuarta ventaja del uso de una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo en un oligonucleótido de la invención es también, por lo tanto, la de evitar estructuras cuádruplex que han sido asociadas a actividad antitrombótica (referencia 62) así como a la unión a, y la inhibición de, los receptores depuradores de los macrófagos (referencia 63.).

[0010] Una quinta ventaja del uso de una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo en un oligonucleótido de la invención es la de permitir el diseño de un oligonucleótido con una cinética de unión de ARN y/o propiedades termodinámicas mejoradas.

La cinética de unión de ARN y/o las propiedades termodinámicas son, al menos en parte, determinadas por la temperatura de fusión de un oligonucleótido (T_m ; calculada con el calculador de propiedades oligonucleótidas (<http://www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html>) para ARN monocatenario que utiliza la T_m básica y el modelo del vecino más cercano), y/o la energía libre del complejo de exón dirigido a AON (usando RNA structure versión 4.5).

Si una T_m es demasiado alta, se espera que el oligonucleótido sea menos específico.

Una T_m y una energía libre aceptables dependen de la secuencia del oligonucleótido.

Por lo tanto, es difícil de dar rangos preferidos para cada uno de estos parámetros.

Una T_m aceptable puede oscilar entre 35 y 65°C y una energía libre aceptable puede oscilar entre 15 y 45 kcal/mol.

[0011] La persona experta puede, por lo tanto, elegir primero un oligonucleótido como compuesto terapéutico potencial.

En un segundo paso, puede usar la invención para optimizar más dicho oligonucleótido haciendo decrecer su inmunogenicidad y/o evitando la agregación y/o la formación de cuádruplex y/o optimizando su T_m y/o la energía libre del complejo dirigido a AON.

Puede tratar de introducir al menos una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo en dicho oligonucleótido en una posición adecuada y valorar cómo la inmunogenicidad y/o la agregación y/o la formación de cuádruplex y/o la T_m y/o la energía libre del complejo dirigido a AON han sido alteradas por la presencia de dicha inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo.

Si la alteración no proporciona la alteración o reducción de la inmunogenicidad y/o agregación y/o formación de cuádruplex y/o su T_m y/o energía libre del complejo dirigido a AON deseadas, la persona experta puede elegir introducir una otra inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo en dicho oligonucleótido y/o introducir una inosina dada y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo en una posición adecuada diferente dentro de dicho oligonucleótido.

[0012] Un oligonucleótido que comprende una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo se puede definir como un oligonucleótido donde al menos un nucleótido ha sido sustituido por una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo.

La persona experta sabe cómo comprobar si un nucleótido contiene una base capaz de formar un par de bases de balanceo.

Ya que, por ejemplo, la inosina puede formar un par de bases con uracilo, adenina, y/o citosina, significa que al menos un nucleótido capaz de formar un par de bases con uracilo, adenina y/o citosina ha sido sustituido por inosina.

Sin embargo, para salvaguardar la especificidad, la inosina que contiene oligonucleótidos preferiblemente comprende la sustitución de al menos uno, dos, tres, cuatro nucleótido(s) capaces de formar un par de bases con uracilo o adenina o citosina cuando se retiene un nivel aceptable de una actividad funcional de dicho oligonucleótido

tal y como se define más adelante en este documento.

Un oligonucleótido que comprende una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo es preferiblemente un oligonucleótido, que sigue siendo capaz de mostrar un nivel aceptable de una actividad funcional de un oligonucleótido correspondiente que no comprende una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo.

Una actividad funcional de dicho oligonucleótido consiste preferiblemente en proporcionar a un individuo una proteína distrofina y/o ARNm funcional y/o disminuir al menos en parte la producción de una proteína distrofina y/o ARNm aberrante.

Cada una de estas características se definen más adelante en este documento.

Un nivel aceptable de tal actividad funcional es preferiblemente al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% de la actividad funcional del oligonucleótido correspondiente que no comprende una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo.

Dicha actividad funcional puede ser tal y como se mide en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo o in vitro en una célula por comparación con la actividad funcional de unos oligonucleótidos correspondientes que no comprenden una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo.

La evaluación de la funcionalidad se puede realizar en el nivel del ARNm, preferiblemente utilizando RT-PCR.

La evaluación de la funcionalidad se puede realizar en el nivel de las proteínas, preferiblemente utilizando el análisis de electrotransferencia o el análisis de inmunofluorescencia de secciones transversales.

[0013] En el contexto de la divulgación, una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo tal y como están presentes en un oligonucleótido está/están presente(s) en una parte de dicho oligonucleótido que es complementaria a por lo menos parte de un exón de pre-ARNm de distrofina o al menos parte de una región sin exón de un pre-ARNm de distrofina, dicha parte siendo una extensión contigua que comprende al menos 8 nucleótidos.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida, un oligonucleótido que comprende una inosina y/o un nucleótido con una base capaz de formar un par de bases de balanceo o un equivalente funcional del mismo, donde el oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, comprende una secuencia que es complementaria a por lo menos parte de un exón de pre-ARNm de distrofina o al menos a parte de una región sin exón de un pre-ARNm de distrofina, dicha parte siendo una extensión contigua que comprende al menos 8 nucleótidos y donde dicha inosina y/o un nucleótido con una base está/están presente(s) en la secuencia oligonucleotídica que es complementaria por lo menos a parte de un pre-ARNm de distrofina tal y como se define en la frase precedente.

[0014] Sin embargo, como se define más adelante, tal inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo también puede estar presente en una fracción de enlace presente en un oligonucleótido de la divulgación.

Las fracciones de enlace preferidas se definen más adelante en el presente documento.

En una forma de realización preferida, un oligonucleótido según la invención es preferiblemente un medicamento.

Más preferiblemente, dicho medicamento es para prevenir o tratar la distrofia muscular de Duchenne o la distrofia muscular de Becker en un individuo o un paciente.

Tal y como se define en este documento, un pre-ARNm de DMD significa preferiblemente el pre-ARNm de un gen DMD de un paciente de DMD o de BMD.

Con paciente se pretende designar un paciente con DMD o BMD o un paciente susceptible de desarrollar DMD o BMD debido a su contexto genético.

En el caso de un paciente de DMD, un oligonucleótido usado corregirá preferiblemente al menos una de las mutaciones de DMD según están presentes en el gen DMD de dicho paciente y, por lo tanto, preferiblemente creará una distrofina que se parecerá a una distrofina de BMD: dicha distrofina preferiblemente será una distrofina funcional según se define más adelante en este documento.

En el caso de un paciente de BMD, un oligonucleótido usado corregirá preferiblemente al menos una de las mutaciones BMD según están presentes en el gen DMD de dicho paciente y, por lo tanto, preferiblemente crearán una, o más de una, distrofina, que será más funcional que la distrofina que estaba originalmente presente en dicho paciente de BMD.

Aún más preferiblemente, dicho medicamento proporciona a un individuo una o más (de una) proteína(s) de distrofina y/o ARNm funcionales y/o reduce al menos en parte la producción de una proteína distrofina y/o ARNm aberrante.

Preferiblemente, un método de la invención mediante la inducción y/o la estimulación del salto de al menos un exón del pre-ARNm de DMD como se identifica aquí en una o más células, preferiblemente células musculares de un paciente, proporciona a dicho paciente una producción aumentada de una proteína distrofina y/o ARNm más funcional y/o reduce la producción de una proteína distrofina y/o ARNm aberrante o menos funcional en dicho paciente.

El proporcionar a un paciente una proteína distrofina y/o ARNm más funcional y/o la disminución de la producción de una proteína distrofina y/o ARNm aberrante en dicho paciente se aplica típicamente a un paciente de DMD.

El aumento de la producción de una distrofina y/o ARNm más funcional o funcional se aplica típicamente en un paciente de BMD.

Por lo tanto, un método preferido es un método en el que se proporciona a un paciente o a una o varias células de dicho paciente una producción aumentada de una proteína distrofina y/o ARNm más funcional o funcional y/o en el que se disminuye la producción de una proteína distrofina y/o ARNm aberrante en dicho paciente, donde el nivel de dicha proteína distrofina y/o ARNm aberrante o más funcional se evalúa por comparación con el nivel de dicha

distrofina y/o ARNm en dicho paciente al comienzo del método.

[0015] Tal y como se define en este documento, una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina de tipo salvaje que corresponde con una proteína que contiene la secuencia de aminoácidos según se identifica en la SEC ID n.º: 1.

Una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina, que tiene un dominio de unión de actina en su parte N-terminal (primeros 240 aminoácidos del extremo N-terminal), un dominio rico en cisteína (aminoácido 3361 a 3685) y un dominio C-terminal (últimos 325 aminoácidos del extremo C-terminal) cada uno de estos dominios que está presente en una distrofina de tipo salvaje, tal y como sabe la persona experta.

Los aminoácidos indicados aquí corresponden con aminoácidos de la distrofina de tipo salvaje que es representada por la SEC ID n.º: 1.

En otra forma de realización, una distrofina funcional es una distrofina que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de una distrofina de tipo salvaje. "Al menos hasta cierto punto" preferiblemente significa al menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% de una actividad correspondiente a una distrofina funcional de tipo salvaje.

En este contexto, una actividad de una distrofina de tipo salvaje es preferiblemente la unión a actina y al complejo de glicoproteínas asociado a la distrofina (DGC)⁵⁶.

La unión de la distrofina a actina y al complejo DGC se puede visualizar mediante o bien co-inmunoprecipitación que usa extractos de proteínas totales o bien análisis de inmunofluorescencia de secciones transversales, de una biopsia de un músculo que se sospecha que es distrófico, como sabe la persona experta.

[0016] Los individuos que padecen distrofia muscular de Duchenne típicamente tienen una mutación en el gen que codifica la distrofina de que evita la síntesis de la proteína completa, es decir, una parada prematura evita la síntesis del extremo C-terminal de la proteína.

En la distrofia muscular de Becker, el gen de la distrofina también comprende una mutación en comparación con el tipo salvaje, pero la mutación típicamente no incluye una parada prematura y el extremo C-terminal de la proteína típicamente es sintetizado.

Como resultado, se sintetiza una proteína distrofina funcional que tiene al menos el mismo tipo de actividad que una proteína de tipo salvaje, aunque no necesariamente la misma cantidad de actividad.

En una forma de realización preferida, una proteína distrofina funcional significa un gen de distrofina dentro del marco.

El genoma de un individuo con BMD codifica típicamente una proteína distrofina que comprende la parte N-terminal (primeros 240 aminoácidos del extremo N-terminal), un dominio rico en cisteína (aminoácidos 3361 a 3685) y un dominio C-terminal (últimos 325 aminoácidos del extremo C-terminal) pero su dominio central con forma de barra puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje⁵⁶.

El salto de exón para el tratamiento de DMD está preferiblemente pero no exclusivamente dirigido a superar una parada prematura en el pre-ARNm mediante el salto de un exón en el dominio con forma de barra para corregir el marco de lectura y permitir la síntesis del resto de la proteína distrofina incluyendo el extremo C-terminal, aunque que la proteína es algo más pequeña como resultado de un dominio de barra menor.

En una forma de realización preferida, a un individuo con DMD y que está siendo tratado utilizando un oligonucleótido tal y como se define en el presente documento se le proporciona una distrofina, que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de una distrofina de tipo salvaje.

Más preferiblemente, si dicho individuo es un paciente de Duchenne o se sospecha que puede ser un paciente de Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina de un individuo con BMD: preferiblemente dicha distrofina es capaz de interactuar tanto con la actina y el DGC, pero su dominio central con forma de barra puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus et al (2006, ref 56).

El dominio central de barra de la distrofina de tipo salvaje comprende 24 repeticiones de tipo espectrina⁵⁶.

Por ejemplo, un dominio central con forma de barra de una distrofina como se proporciona aquí puede comprender de 5 a 23, de 10 a 22 o de 12 a 18 repeticiones de tipo espectrina mientras se pueda enlazar con actina y con DGC.

La disminución de la producción de una distrofina aberrante en dicho paciente o en una célula de dicho paciente se puede evaluar en el nivel del ARNm y preferiblemente significa que 99%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos de la cantidad inicial de ARNm de distrofina aberrante sigue siendo detectable por RT PCR.

Un ARNm o una proteína distrofina aberrante también se denomina en este caso como un ARNm o proteína distrofina no funcional o de menos a no funcional o semifuncional.

Una distrofina de pre-ARNm no funcional preferiblemente lleva a una proteína distrofina fuera del marco, lo que significa que no se producirá ni/o se detectará ninguna proteína distrofina.

Una proteína distrofina no funcional es preferiblemente una proteína distrofina que no es capaz de enlazar actina y/o miembros del complejo de proteína DGC.

Una proteína distrofina o ARNm de distrofina no funcional típicamente no tiene o no codifica una proteína distrofina con un extremo C-terminal intacto de la proteína.

[0017] El aumento de la producción de una distrofina funcional en dicho paciente o en una célula de dicho paciente se puede evaluar en el nivel del ARNm (por análisis RT-PCR) y preferiblemente significa que una cantidad detectable de un ARNm de distrofina funcional o dentro del marco es detectable por RT PCR.

En otra forma de realización, un 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del ARNm de la distrofina detectable es un ARNm de distrofina funcional o dentro del marco.

El aumento de la producción de una distrofina funcional en dicho paciente o en una célula de dicho paciente se puede evaluar en el nivel de la proteína (por inmunofluorescencia y análisis de electrotransferencia) y preferiblemente significa que una cantidad detectable de una proteína distrofina funcional es detectable mediante inmunofluorescencia o análisis de electrotransferencia.

5 En otra forma de realización, un 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la proteína distrofina detectable es una proteína distrofina funcional.

[0018] Un aumento o una reducción es preferiblemente evaluada en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo o un paciente por comparación a la cantidad presente en dicho individuo o paciente antes del tratamiento con dicha molécula o composición de la invención.

10 Alternativamente, la comparación puede ser hecha con un tejido muscular o célula de dicho individuo o paciente que todavía no ha sido tratado con dicho oligonucleótido o composición en el caso de que el tratamiento sea local.

[0019] En un método preferido, uno o varios síntoma(s) de un paciente de DMD o BMD es/son aliviado(s) y/o una o varias característica(s) de una célula o tejido muscular de un paciente de DMD o de BMD es/son aliviada(s) utilizando una molécula o una composición de la invención.

15 Tales síntomas se pueden evaluar en el propio paciente.
Tales características se pueden evaluar en el nivel celular y del tejido de un paciente determinado.

20 El alivio de una o varias características se puede evaluar por medio de cualquiera de los ensayos siguientes en una célula miogénica o célula muscular de un paciente: reducción de la absorción de calcio por las células musculares, disminución de la síntesis de colágeno, alteración de la morfología, alteración de la biosíntesis de lípidos, disminución del estrés oxidativo, y/o mejora de la función, integridad, y/o supervivencia de la fibra muscular.

Estos parámetros normalmente son evaluados usando inmunofluorescencia y/o análisis histoquímicos de secciones transversales de biopsias de músculo.

25 [0020] El alivio de uno o varios síntoma(s) de la distrofia muscular de Duchenne o de la distrofia muscular de Becker en un individuo utilizando una molécula o una composición de la invención se puede evaluar mediante cualquiera de las pruebas siguientes: prolongación del tiempo para la pérdida de la capacidad de andar, mejora de la fuerza muscular, mejora de la capacidad para levantar peso, mejora del tiempo que se tarda en levantarse del suelo, mejora en el tiempo que se tarda en caminar nueve metros, mejora en el tiempo que se tarda en subir cuatro escaleras, mejora del grado de función de la pierna, mejora de la función pulmonar, mejora de la función cardíaca, mejora de la calidad de vida.

30 Cada uno de estas pruebas es conocida por la persona experta.
Como ejemplo, la publicación de Manzur et al (2008, ref 58) da una explicación extensa de cada una de estas pruebas.

35 Para cada una de estas pruebas, tan pronto como se encuentra una mejora o prolongación detectable de un parámetro medido en una prueba, preferiblemente significará que uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne o de distrofia muscular de Becker ha sido aliviados en un individuo que utiliza una molécula o composición de la invención.

40 La mejora o prolongación detectable es preferiblemente una mejora o prolongación estadísticamente significativa como se describe en Hodgetts et al (2006, ref 57).

Alternativamente, el alivio de uno o varios síntoma(s) de la distrofia muscular de Duchenne o de la distrofia muscular de Becker se puede evaluar mediante la medición de una mejora de la función, integridad y/o supervivencia de una fibra muscular como se defina más adelante en este documento.

45 [0021] Un oligonucleótido como se utiliza en este caso comprende preferiblemente un oligonucleótido antisentido o un oligorribonucleótido antisentido.

En una forma de realización preferida se aplica una técnica de salto de exón.

El salto de exón interfiere con los procesos de empalme naturales que ocurren dentro de una célula eucariota.

50 En eucariotas más altas, la información genética para proteínas del ADN de la célula se codifica en exones que están separados entre sí por secuencias intrónicas.

Estos intrones son en algunos casos muy largos.

La maquinaria de transcripción de eucariotas genera un pre-ARNm que contiene tanto exones como intrones, mientras que la maquinaria de empalme, frecuentemente ya durante la producción del pre-ARNm, genera la región de codificación real para la proteína mediante el empalme de los exones presentes en el pre-ARNm.

55 [0022] El salto de exón produce ARNm maduro que carece de al menos un exón saltado.

Así, cuando dicho exón codifica aminoácidos, el salto de exón lleva a la expresión de un producto alterado.

la tecnología para el salto de exón de está actualmente dirigida hacia el uso de oligonucleótidos antisentido (AON).

60 Gran parte de este trabajo se hace en el modelo de ratón mdx para la distrofia muscular de Duchenne.

El ratón mdx lleva una mutación sin sentido en el exón 23.

A pesar de la mutación del mdx, que debería impedir la síntesis de una proteína distrofina funcional, se han observado fibras positivas de distrofina raras y de origen natural en el tejido muscular del mdx.

65 Se piensa que estas fibras positivas en distrofina han surgido de un mecanismo de salto de exón aparentemente de origen natural, o bien debido a mutaciones somáticas o a través de empalme alternativo.

Se ha observado que los AON dirigidos a, respectivamente, los sitios de empalme 3' y/o 5' de los intrones 22 y 23 en

el pre-ARNm de distrofina, interfieren con factores normalmente implicados en la eliminación del intrón 23 de modo que también el exón 23 fue eliminado del ARNm^{3, 5, 6, 39, 40}.

[0023] Mediante el salto previsto de un exón específico, un fenotipo de DMD se convierte en un fenotipo de BMD más suave.

En la divulgación, el salto de un exón es preferiblemente inducido por la unión de AON dirigidos a uno o ambos de los sitios de empalme, o secuencias internas de exón.

Un oligonucleótido de la invención dirigido hacia una secuencia interna de exón típicamente no muestra ningún solapamiento con secuencias sin exón.

Preferiblemente no se solapa con los sitios de empalme, al menos cuando éstos están presentes en el intrón.

Un oligonucleótido dirigido hacia una secuencia interna de exón preferiblemente no contiene una secuencia complementaria a un intrón adyacente.

Así, también se proporciona un oligonucleótido según la invención, donde dicho oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, es para inhibir la inclusión de un exón de un pre-ARNm de distrofina en el ARNm producido del empalme de dicho pre-ARNm.

Una técnica de salto de exón es preferiblemente aplicada de manera que la ausencia de un exón de ARNm producido a partir del pre-ARNm de distrofina genera una región de codificación para una proteína distrofina más funcional, aunque más corta.

En este contexto, la inhibición de la inclusión de un exón preferiblemente significa que la detección del ARNm y/o proteína distrofina original aberrante es disminuida como se ha definido anteriormente en el presente documento.

[0024] Ya que un exón de un pre-ARNm de distrofina sólo será incluido en el ARNm resultante cuando los sitios de empalme son reconocidos por el complejo espliceosoma, los sitios de empalme han sido objetivos obvios para los AON.

Una forma de realización de la divulgación, por lo tanto, proporciona un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende una secuencia que es complementaria a una región sin exón de una distrofina pre-ARNm.

En una forma de realización de la divulgación se usa un AON que solamente es complementario a una región sin exón de una distrofina pre-ARNm.

Esto, sin embargo, no necesario: también es posible usar un AON que comprende una secuencia específica de intrón así como una secuencia específica de exón.

Tal AON de la divulgación comprende una secuencia que es complementaria a una región sin exón de una distrofina pre-ARNm, así como una secuencia que es complementaria a una región de exón de una distrofina pre-ARNm.

Por supuesto, un AON no es necesariamente complementario a la secuencia entera de un exón o intrón de distrofina.

Los AON de la divulgación, que son complementarios a una parte de tal exón o intrón, son preferidos.

Un AON de la divulgación es preferiblemente complementario por lo menos a parte de un exón y/o intrón de distrofina, dicha parte teniendo al menos 8, 10, 13, 15, 20 nucleótidos.

[0025] El empalme de un pre-ARNm de distrofina ocurre a través de dos reacciones de transesterificación secuenciales.

Primero, el 2'OH de un nucleótido de punto de ramificación específico en el intrón que se define durante el ensamblaje de espliceosoma lleva a cabo un ataque nucleofílico en el primer nucleótido del intrón en el sitio de empalme 5' que forma el lazo intermedio.

En segundo lugar, el 3'OH del exón liberado lleva a cabo un ataque nucleofílico en el último nucleótido del intrón en el sitio de empalme 3', juntando así los exones y liberando el lazo del intrón.

Así, el punto de ramificación y los sitios de empalme de un intrón están implicados en un evento de empalme.

Por lo tanto, un oligonucleótido de la divulgación que comprende una secuencia, que es complementaria a tal punto de ramificación y/o sitio de empalme, es preferiblemente usada para el salto de exón.

Además, se proporciona, por lo tanto, un oligonucleótido de la divulgación, o un equivalente funcional del mismo, que comprende una secuencia que es complementaria a un sitio de empalme y/o punto de ramificación de una pre-ARNm de distrofina.

[0026] Ya que los sitios de empalme contienen secuencias de consenso, el uso de un oligonucleótido o un equivalente funcional del mismo de la divulgación (aquí también llamado un AON) que comprende una secuencia que es complementaria de un sitio de empalme implica el riesgo de hibridación promiscua.

La hibridación de AON a otros sitios de empalme que los sitios del exón por ser saltado podría fácilmente interferir con la exactitud del proceso de empalme.

Para superar estos y otros problemas potenciales relacionados con el uso de AON que son complementarios a una secuencia de intrón, una forma de realización preferida de la divulgación proporciona un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende una secuencia que es complementaria a un exón de pre-ARNm de distrofina.

Preferiblemente, dicho AON es capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de al menos un exón en dicho pre-ARNm de distrofina.

Interferir con una señal de inclusión de exón (EIS) tiene la ventaja de que tales elementos se sitúan en el exón.

Al proporcionar un AON para el interior del exón por ser saltado, es posible interferir con la señal de inclusión del

exón, así enmascarando eficazmente el exón frente al aparato de empalme.

La incapacidad del empalme para reconocer el exón por ser saltado así lleva a la exclusión del exón del ARNm final. Esta forma de realización no interfiere directamente con el proceso enzimático de la maquinaria de empalme (la unión de los exones).

5 Se piensa que esto permite que el método sea más específico y/o fiable.

Se piensa que una EIS es una estructura particular de un exón que permite que el aceptor y el donador de empalme adopten una conformación espacial particular.

En este concepto, es la conformación espacial particular la que permite a la maquinaria de empalme reconocer el exón.

10 Sin embargo, la invención ciertamente no se limita a este modelo.

En una forma de realización preferida, se hace uso de un oligonucleótido, que es capaz de unirse a un exón y es capaz de inhibir un EIS.

Un AON específicamente puede entrar en contacto con dicho exón en cualquier punto y todavía ser capaz de inhibir específicamente dicho EIS.

15 [0027] En el contexto de la invención, un equivalente funcional de un oligonucleótido significa preferiblemente un oligonucleótido tal y como se define en este documento, donde uno o varios nucleótidos han sido sustituidos y donde una actividad de dicho equivalente funcional se retiene por lo menos hasta cierto punto.

Preferiblemente, una actividad de dicho equivalente funcional proporciona una proteína distrofina funcional.

20 Dicha actividad de dicho equivalente funcional es, por lo tanto, evaluada preferiblemente mediante la cuantificación de la cantidad de una proteína distrofina funcional o mediante la cuantificación de la cantidad de un ARNm de distrofina funcional.

Una proteína distrofina funcional (o un ARNm de distrofina funcional) es preferiblemente definido en este documento como una proteína distrofina (o una proteína distrofina codificada por dicho ARNm) capaz de enlazar actina y miembros de la proteína DGC.

25 La evaluación de dicha actividad de un oligonucleótido es preferiblemente hecha por RT-PCR (ARN-m) o por inmunofluorescencia o inmunoelectrotransferencia (proteína).

Dicha actividad es preferiblemente retenida al menos hasta cierto punto cuando representa al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o más de actividad correspondiente de dicho oligonucleótido del que deriva el equivalente.

30 Tal actividad se puede medir en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo o in vitro en una célula mediante comparación con una actividad de un oligonucleótido correspondiente de dicho oligonucleótido del que deriva el equivalente funcional.

35 En toda esta solicitud, cuando la palabra oligonucleótido se usa, se puede sustituir por un equivalente funcional del mismo tal y como se define en el presente documento.

[0028] Por lo tanto, un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende o consiste en una secuencia que es complementaria a un exón de pre-ARNm de distrofina proporciona buenos resultados terapéuticos para DMD.

40 En una forma de realización preferida, se usa un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende o consiste en una secuencia que es complementaria por lo menos de parte de cualquiera de los exones de pre-ARNm de distrofina 2 a 75, dicha parte que tiene o que comprende al menos 13 nucleótidos.

Sin embargo, dicha parte también puede tener al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nucleótidos.

45 En la divulgación, dicha parte también puede tener al menos 8, 9, 10, 11, 12 nucleótidos.

Una parte de pre-ARNm de distrofina de la que un oligonucleótido es complementaria también se puede llamar una extensión contigua de pre-ARNm de distrofina.

50 [0029] De la forma más preferible se usa un AON que comprende o consiste en una secuencia que es complementaria de por lo menos parte del exón de pre-ARNm de distrofina 51, 45, 53, 44, 46, 52, 50, 43, 6, 7, 8, 55, 2, 11, 17, 19, 21, 57, 59, 62, 63, 65, 66, 69, y/o 75, dicha parte que tiene o que comprende al menos 13 nucleótidos.

Sin embargo, dicha parte también puede tener al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nucleótidos.

En la divulgación, dicha parte también puede tener al menos 8, 9, 10, 11, 12 nucleótidos.

55 Los oligonucleótidos más preferidos están representados por una secuencia que comprende o consiste en cada una de las secuencias siguientes SEC ID N°: 2 a SEC ID N°: 539, donde al menos una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo está presente en dicha secuencia.

Preferiblemente, una inosina ha sido introducida en una de estas secuencias para reemplazar una guanósina, una adenina, o un uracilo.

60 Por consiguiente, un oligonucleótido aún más preferido como se utiliza en este caso está representado por una secuencia que comprende o consiste en SEC ID N°:2 a SEC ID N°:486 o SEC ID N°:539, aún más preferiblemente SEC ID N°:2 a N° 237 o SEC ID N°:539, de la forma más preferible SEC ID N°:76 donde al menos una inosina y/o una base capaz de formar un par de bases de balanceo está presente en dicha secuencia.

65 Preferiblemente, una inosina ha sido introducida en una de estas secuencias para reemplazar una guanósina, una adenina, o un uracilo.

[0030] Por consiguiente, en otra forma de realización preferida, un oligonucleótido como se utiliza en este caso está representado por una secuencia que comprende o consiste en SEC ID N°:540 a SEC ID N°:576.

Más preferiblemente, un oligonucleótido como se utiliza en este caso está representado por una secuencia que comprende o consiste en SEC ID N°:557.

5 [0031] Dichos exones se enumeran en orden decreciente de aplicabilidad a población de pacientes.

Por lo tanto, el uso de un AON que comprende una secuencia que es complementaria por lo menos de parte de exón de pre-ARNm de distrofina 51 es adecuado para el uso en una parte más grande de la población de pacientes de DMD en comparación con un AON que comprende una secuencia que es complementaria del exón de pre-ARNm de distrofina 44, et cetera.

10 [0032] En una forma de realización preferida, un oligonucleótido de la invención, que comprende una secuencia que es complementaria a parte del pre-ARNm de distrofina es tal que la parte complementaria es al menos 50% de la longitud del oligonucleótido de la invención, más preferiblemente al menos 60%, aún más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90% o aún más preferiblemente al menos 95%, o aún más preferiblemente 98% o aún más preferiblemente al menos 99%, o aún más preferiblemente 100%.

En una forma de realización más preferida, el oligonucleótido de la invención consiste en una secuencia que es complementaria a parte del pre-ARNm de distrofina tal y como se define aquí.

20 Como ejemplo, un oligonucleótido puede comprender una secuencia que es complementaria a parte del pre-ARNm de distrofina tal y como se define aquí y secuencias flanqueadoras adicionales.

En una forma de realización más preferida, la longitud de dicha parte complementaria de dicho oligonucleótido es de al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nucleótidos.

25 En la divulgación, dicha parte también puede tener al menos 8, 9, 10, 11, 12 nucleótidos. Preferiblemente, se utilizan secuencias flanqueantes adicionales para modificar la unión de una proteína al oligonucleótido, o para modificar una propiedad termodinámica del oligonucleótido, más preferiblemente para modificar la afinidad de unión de ARN objetivo.

30 [0033] Una forma de realización preferida proporciona un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo que comprende:

- una secuencia que es complementaria a una región de un exón de pre-ARNm de distrofina que está hibridizada a otra parte de un exón de pre-ARNm de distrofina (estructura cerrada), y
- una secuencia que es complementaria a una región de un exón de pre-ARNm de distrofina que no está hibridizada en dicho pre-ARNm de distrofina (estructura abierta).

35 [0034] Para esta forma de realización, se hace referencia a WO 2004/083432. Las moléculas de ARN poseen estructuras secundarias fuertes, principalmente debido al apareamiento de bases de extensiones complementarias o parcialmente complementarias dentro del mismo ARN.

40 Desde hace mucho tiempo se ha pensado que las estructuras del ARN desempeñan un papel en la función del ARN. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la estructura secundaria del ARN de un exón desempeña un papel en la estructuración del proceso de empalme.

La estructura de un exón es un parámetro que se cree que dirige su inclusión en el ARNm.

Sin embargo, otros parámetros también puede desempeñar un papel en esto.

45 Aquí, a esta función de señalización se hace referencia como una señal de inclusión de exón.

Un oligonucleótido complementario de esta forma de realización es capaz de interferir con la estructura del exón y así ser capaz de interferir con la señal de inclusión de exón del exón.

Se ha descubierto que muchos oligonucleótidos complementarios de hecho comprenden esta capacidad, algunos más eficaces que otros.

50 Los oligonucleótidos de esta forma de realización preferida, es decir aquéllos con dicho solapamiento dirigido hacia estructuras abiertas y cerradas en el ARN del exón nativo, son una selección de todos los oligonucleótidos posibles.

La selección abarca oligonucleótidos que pueden interferir de forma eficiente con una señal de inclusión de exón.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se piensa que el solapamiento con una estructura abierta mejora la eficiencia de invasión del oligonucleótido y evita la unión de factores de empalme (es decir, aumenta la eficiencia con la cual el oligonucleótido puede introducirse en la estructura), mientras que el solapamiento con la estructura cerrada aumenta posteriormente la eficiencia de la interferencia de con la estructura secundaria del ARN del exón, y así interfieren con la señal de inclusión de exón.

Se ha descubierto que la longitud de la complementariedad parcial para la estructura cerrada y abierta no está extremadamente restringida.

60 Hemos observado altas eficiencias con oligonucleótidos con longitudes variables de complementariedad en ambas estructuras.

El término complementariedad se utiliza en este caso para referirse a una extensión de ácidos nucleicos que se pueden hibridar a otra extensión de ácidos nucleicos bajo condiciones fisiológicas.

Por lo tanto, no es absolutamente requerido que todas las bases en la región de complementariedad sean capaces de aparearse con bases de la cadena opuesta.

65 Por ejemplo, al diseñar el oligonucleótido, se puede querer incorporar, por ejemplo, un residuo que no forma un par

de bases con la base de la cadena complementaria.

Los desapareamientos, hasta cierto punto, se pueden permitir, si dadas las circunstancias en la célula, la extensión de nucleótidos es suficientemente capaz de hibridarse a la parte complementaria.

5 En este contexto, "suficientemente" preferiblemente significa que, utilizando un ensayo de cambio de movilidad en gel como se describe en el ejemplo 1 de la EP 1619 249, una unión de un oligonucleótido es detectable.

Opcionalmente, dicho oligonucleótido puede ser además evaluado por transfección en células musculares de pacientes.

El salto del exón objetivo se puede evaluar mediante RT-PCR (como se describe en EP 1 619 249).

10 Las regiones complementarias están preferiblemente diseñadas de manera que, cuando se combinan, son específicas para el exón en el pre-ARNm.

Tal especificidad se puede crear con varias longitudes de regiones complementarias, ya que depende de las secuencias reales en otro (pre-)mRNA del sistema.

El riesgo de que también uno o varios de otro pre-ARNm sea(n) capaz/capaces de hibridar al oligonucleótido se reduce con el aumento de tamaño del oligonucleótido.

15 Está claro que los oligonucleótidos que comprenden desapareamientos en la región de complementariedad pero que retienen la capacidad para hibridarse a la(s) región(es) prevista(s) en el pre-ARNm se pueden usar en la presente invención.

Sin embargo, preferiblemente al menos las partes complementarias no comprenden tales desapareamientos, ya que típicamente tienen una eficiencia más alta y una especificidad más alta que los oligonucleótidos que tienen tales desapareamientos en una o más regiones complementarias.

20 Se piensa que las fuerzas de hibridación más altas (es decir, un número en aumento de interacciones con la cadena opuesta) son favorables para aumentar la eficiencia del proceso de la interferencia con la maquinaria de empalme del sistema.

Preferiblemente, la complementariedad es de entre 90 y 100%.

25 En general, esto permite aproximadamente 1 o 2 desapareamiento(s) en un oligonucleótido de alrededor de 20 nucleótidos

[0035] La estructura secundaria se analiza mejor en el contexto del pre-ARNm en el que el exón reside.

Tal estructura se puede analizar en el ARN real.

30 Sin embargo, actualmente es posible predecir la estructura secundaria de una molécula de ARN (con costes de energía mínimos) bastante bien usando programas de modelado de estructura.

Un ejemplo no limitativo de un programa adecuado es ARN mfold versión 3.1 server ⁴¹.

Un experto en la técnica será capaz de predecir, con reproducibilidad adecuada, una estructura posible del exón, dada la secuencia de nucleótidos.

35 Las mejores predicciones se obtienen cuando se proporciona a dichos programas de modelación tanto el exón como las secuencias de intrones flanqueantes.

Típicamente no es necesario modelar la estructura de todo el pre-ARNm.

40 [0036] La estructura abierta y cerrada a la que el oligonucleótido es dirigido son preferiblemente adyacentes la una a la otra.

Se piensa que, de esta manera, la hibridación del oligonucleótido a la estructura abierta induce la apertura de la estructura cerrada a partir de lo cual la hibridación interior de esta estructura cerrada.

A través de esta acción, la estructura previamente cerrada asume una conformación diferente.

La conformación diferente produce la interrupción de la señal de inclusión de exón.

45 Sin embargo, cuando hay secuencias aceptoras y/o donadoras potenciales de empalme (críticas) presentes en el exón objetivo, ocasionalmente se genera una nueva señal de inclusión de exón que define un (neo) exón diferente, es decir, con un extremo 5' diferente, un extremo 3' diferente, o ambos.

Este tipo de actividad está dentro del alcance de la presente invención, ya que el exón objetivo es excluido del ARNm.

50 La presencia de un exón nuevo, que contiene parte del exón objetivo, en el ARNm no altera el hecho de que el exón objetivo, como tal, es excluido.

La inclusión de un neoexón puede verse como un efecto secundario, que ocurre sólo ocasionalmente.

Hay dos posibilidades cuando el salto de exón se utiliza para restaurar (parte de) un marco de lectura abierto de distrofina que es interrumpido como resultado de una mutación.

55 Una es que el neoexón sea funcional en la restauración del marco de lectura, mientras que en el otro caso el marco de lectura no se restaura.

Cuando se seleccionan oligonucleótidos para restaurar los marcos de lectura de la distrofina mediante salto de exón, por supuesto está claro que bajo estas condiciones sólo se seleccionan aquellos oligonucleótidos que de hecho suponen salto de exón que restaura el marco de lectura abierto de distrofina, con o sin un neoexón.

60 [0037] También se proporciona un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende una secuencia que es complementaria a un sitio de unión para una proteína arginina-serina (SR) en el ARN de un exón de un pre-ARNm de distrofina.

65 En WO 2006/112705 hemos descrito la presencia de una correlación entre la efectividad de un (AON) de oligonucleótido antisentido interno del exón para la inducción del salto de exón y la presencia de un sitio de unión de SR predicho (por ejemplo mediante ESE finder) en el sitio de pre-ARNm objetivo de dicho AON.

Por lo tanto, en una forma de realización, se genera un oligonucleótido que comprende la determinación de un sitio de unión (putativo) para una proteína SR (Ser-Arg) en el ARN de un exón de distrofina y la producción de un oligonucleótido que es complementario a dicho ARN y que se solapa al menos parcialmente a dicho sitio de unión (putativo).

5 El término "se solapa al menos parcialmente" se define en este caso para comprender un solapamiento de un único nucleótido de un sitio de unión de SR, así como múltiples nucleótidos de dicho sitio de unión, así como un solapamiento completo de dicho sitio de unión.

Esta forma de realización preferiblemente comprende además la determinación, a partir de una estructura secundaria de dicho ARN, de una región que está hibridada a otra parte de dicho ARN (estructura cerrada) y una
10 región que no está hibridada en dicha estructura (estructura abierta), y posteriormente la generación de un oligonucleótido que se solapa al menos parcialmente a dicho sitio de unión (putativo) y que se solapa al menos a parte de dicha estructura cerrada y se solapa al menos a parte de dicha estructura abierta.

De esta manera, aumentamos la oportunidad de obtener un oligonucleótido que es capaz de interferir con la inclusión de exón del pre-ARNm en el ARNm.

15 Es posible que una primera región de unión de SR seleccionada no tenga la estructura abierta-cerrada requerida, en cuyo caso se selecciona otro (segundo) sitio de unión de proteínas SR que es luego posteriormente evaluado para detectar la presencia de una estructura abierta-cerrada.

Este proceso es continuado hasta que se identifica una secuencia que contiene un sitio de unión de proteínas SR así como una estructura abierta-cerrada (parcialmente solapada).

20 Esta secuencia es luego usada para diseñar un oligonucleótido que es complementario a dicha secuencia.

[0038] Tal método para generar un oligonucleótido, es también realizado por inversión del orden descrito, es decir, primero la generación de un oligonucleótido que comprende la determinación, a partir de una estructura secundaria de ARN de un exón de distrofina, de una región que asume una estructura que está hibridada a otra parte de dicho
25 ARN (estructura cerrada) y una región que no está hibridado en dicha estructura (estructura abierta), y posteriormente la generación de un oligonucleótido, del cual al menos una parte de dicho oligonucleótido es complementaria a dicha estructura cerrada y del cual al menos otra parte de dicho oligonucleótido es complementaria a dicha estructura abierta.

30 Esto es luego seguido de la determinación de si un sitio de unión de proteínas SR al menos se solapa con dicha estructura abierta/cerrada.

De esta manera, el método de WO 2004/083432 es mejorado.

En otra forma de realización, las selecciones se realizan simultáneamente.

[0039] Sin desear quedar limitado por ninguna teoría, actualmente se piensa que el uso de un oligonucleótido dirigido a un sitio de unión de proteínas SR perjudica (al menos parcialmente) la unión de una proteína SR al sitio
35 de unión de una proteína SR, que resulta en un empalme interrumpido o perjudicado.

[0040] Preferiblemente, una estructura abierta/cerrada y un sitio de unión de proteínas SR se solapan parcialmente, e incluso más preferiblemente una estructura abierta/cerrada se solapa completamente a un sitio de unión de
40 proteínas SR o un sitio de unión a proteínas SR se solapa completamente a una estructura abierta/cerrada.

Esto permite una interrupción mejorada de la inclusión del exón.

[0041] Además de las secuencias de sitios de empalme de consenso, muchos (si no todos) exones contienen secuencias reguladoras del empalme tales como secuencias intensificadoras del empalme exónico (ESE) para
45 facilitar el reconocimiento de sitios de empalme genuinos por el espliceosoma^{42, 43}.

Un subgrupo de factores de empalme, llamados proteínas SR, puede unirse a estas ESE y reclutar otros factores de empalme, tales como U1 y U2AF para sitios de empalme (débilmente definidos).

Los sitios de unión de las cuatro proteínas SR más abundantes (SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55) han sido analizados en detalle y estos resultados se implementan en ESE finder, una fuente en la web que predice sitios de
50 unión potenciales para estas proteínas SR^{42, 43}.

Hay una correlación entre la eficacia de un AON y la presencia/ausencia de un sitio de unión SF2/ASF, SC35 y SRp40.

55 En una forma de realización preferida, la invención proporciona así una combinación como se ha descrito anteriormente, donde dicha proteína SR es SF2/ASF o SC35 o SRp40.

[0042] En una forma de realización, un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, es capaz de unir específicamente una secuencia de ARN regulador que se requiere para el empalme correcto de un exón de distrofina en una transcripción.

60 Diferentes secuencias de ARN que actúan en cis se requieren para el empalme correcto de exones en una transcripción.

En particular en la divulgación, se identifican elementos suplementarios tales como potenciadores de empalme intrónico o exónico (ISE y ESE) o silenciadores (ISS y ESE) para regular el empalme específico y eficaz de exones constitutivos y alternativos.

65 Al utilizar oligonucleótidos antisentido (AON) específicos de secuencia que se unen con los elementos, su función reguladora se perturba de modo que el exón es saltado, como se muestra para la DMD.

Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la divulgación, se usa un equivalente oligonucleótido o

funcional de los mismos que es complementario a un potenciador de empalme intrónico (ISE), un potenciador de empalme exónico (ESE), un silenciador de empalme intrónico (ISS) y/o un silenciador de empalme exónico (ESS). Como ya se ha descrito aquí antes, un exón de distrofina es, en una forma de realización preferida, saltado por un agente capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de dicho exón, de modo que dicho exón no es reconocido por la maquinaria de empalme como una parte que tiene que ser incluida en el ARNm. Como resultado, se forma un ARNm sin dicho exón.

[0043] Un AON usado en la divulgación es preferiblemente complementario a una parte consecutiva o una extensión contigua de entre 8 y 50 nucleótidos de ARN de exón de distrofina o de ARN de intrón de distrofina.

En una forma de realización, un AON usado aquí es complementario a una parte consecutiva o una extensión contigua de entre 14 y 50 nucleótidos de un ARN de exón de distrofina o un ARN de intrón de distrofina.

Preferiblemente, dicho AON es complementario a una parte consecutiva o extensión contigua de entre 14 y 25 nucleótidos de dicho ARN de exón.

Más preferiblemente, se usa un AON que comprende una secuencia que es complementaria a una parte consecutiva o una extensión contigua de entre 20 y 25 nucleótidos de un ARN de exón de distrofina o de un ARN de intrón de distrofina.

[0044] Se pueden utilizar diferentes tipos de ácido nucleico para generar un oligonucleótido según la invención.

Preferiblemente, dicho oligonucleótido comprende ARN, ya que los híbridos ARN/ARN son muy estables.

Ya que uno de los objetivos de la técnica de salto de exón es dirigir el empalme en sujetos, se prefiere que el ARN del oligonucleótido comprenda una modificación que proporcione al ARN una propiedad adicional, por ejemplo resistencia para endonucleasas, exonucleasas, y RNasa H, fuerza de hibridación adicional, estabilidad aumentada (por ejemplo en un fluido corporal), flexibilidad aumentada o reducida, toxicidad reducida, transporte intracelular aumentado, especificidad para tejido, etc. Preferiblemente, dicha modificación comprende una modificación de oligorribonucleótido en 2'-O-metil-fosforotioato.

Preferiblemente, dicha modificación comprende una modificación de oligorribonucleótido en 2'-O-metil-fosforotioato.

Una forma de realización proporciona así un oligonucleótido para usar que comprende ARN que contiene una modificación, preferiblemente una modificación de ribosa (ARN) o desoxirribosa (ADN) modificada en 2'-O-metilo.

[0045] En una forma de realización, la invención proporciona un oligonucleótido híbrido que comprende un oligonucleótido que comprende una modificación de oligo(deoxi)ribonucleótido en 2'-O-metil-fosforotioato y ácido nucleico bloqueado.

Este oligonucleótido particular comprende una mejor especificidad de secuencia en comparación con un equivalente consistente en ácido nucleico bloqueado, y comprende una efectividad mejorada en comparación con un oligonucleótido consistente en modificación de oligo(deoxi)ribonucleótido en 2'-O-metil-fosforotioato.

[0046] Con el descubrimiento de la tecnología de imitación de ácidos nucleicos se ha hecho posible generar moléculas que tienen unas características de hibridación similares, preferiblemente las mismas, en cuanto al tipo, no necesariamente en cuanto a la cantidad, que el propio ácido nucleico.

Tales equivalentes funcionales, por supuesto, también son adecuados para usar en la invención.

Ejemplos preferidos de equivalentes funcionales de un oligonucleótido son el ácido peptidonucleico de péptido y/o el ácido nucleico bloqueado.

De la forma más preferible, se usa un morfolino fosforodiamidato.

Ejemplos adecuados pero no limitativos de equivalentes de oligonucleótidos de la invención se pueden encontrar en ⁴⁴⁻⁵⁰.

Los híbridos entre uno o varios de los equivalentes entre sí y/o junto con ácido nucleico también son adecuados, por supuesto.

En una forma de realización preferida, el ácido nucleico bloqueado se usa como un equivalente funcional de un oligonucleótido, ya que el ácido nucleico bloqueado muestra una afinidad de objetivo más alta y una toxicidad reducida y, por lo tanto, muestra una eficiencia más alta de salto de exón.

[0047] En una forma de realización, un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que es capaz de inhibir la inclusión de un exón de distrofina en el ARNm de distrofina, se combina con al menos otro oligonucleótido, o equivalente funcional del mismo, que es capaz de inhibir la inclusión de otro exón de distrofina en el ARNm de distrofina.

De esta manera, se evita la inclusión de dos o más exones de un pre-ARNm de distrofina en el ARNm producido a partir de este pre-ARNm.

A esta forma de realización se hace referencia posteriormente como salto doble o multi-exón ^{2, 15}.

En la mayoría de los casos, el salto de exón doble produce la exclusión de sólo los dos exones objetivo del pre-ARNm de distrofina.

Sin embargo, en otros casos se ha observado que los exones objetivo y la región entera entre dichos exones en dicho pre-ARNm no estaban presentes en el ARNm producido incluso cuando otros exones (exones de intervención) estaban presentes en tal región.

Este salto multi-exón fue sobre todo así para la combinación de oligonucleótidos derivados del gen DMD, donde un oligonucleótido para el exón 45 y un oligonucleótido para el exón 51 se añadieron a una célula que transcribe el gen DMD.

Tal configuración resultó en un ARNm producido que no contenía los exones 45 a 51.

Aparentemente, la estructura del pre-ARNm en presencia de los oligonucleótidos mencionados fue tal que la maquinaria de empalme fue estimulada para conectar los exones 44 y 52 entre sí.

Otros ejemplos preferidos de salto multi-exón son:

- 5 – el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 17, y un segundo exón 48 que puede resultar en el salto de dichos ambos exones o de la región entera entre el exón 17 y el exón 48.
- el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 17, y un segundo exón 51 que puede resultar en el salto de dichos ambos exones o de la región entera entre el exón 17 y el exón 51.
- 10 – el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 42, y un segundo exón 55 que puede resultar en el salto de dichos ambos exones o de la región entera entre el exón 42 y el exón 55.
- el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 43, y un segundo exón 51 que puede resultar en el salto de dichos ambos exones o de la región entera entre el exón 43 y el exón 51.
- el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 43, y un segundo exón 55 que puede resultar en el salto de dichos ambos exones o de la región entera entre el exón 43 y el exón 55.
- 15 – el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 45, y un segundo exón 55 que puede resultar en el salto de dicho ambos exones o de la región entera entre el exón 45 y el exón 55.
- el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 45, y un segundo exón 59 que puede resultar en el salto de dichos ambos exones o de la región entera entre el exón 45 y el exón 59.
- el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 48, y un segundo exón 59 que puede resultar en el salto de dichos ambos exones o de la región entera entre el exón 48 y el exón 59.
- 20 – el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 50, y un segundo exón 51 que puede resultar en el salto de dichos ambos exones.
- el uso de un oligonucleótido dirigido al exón 51, y un segundo exón 52 que puede resultar en el salto de dichos ambos exones.

25 [0048] Por lo tanto, en la divulgación también se proporciona un oligonucleótido que comprende al menos 8, preferiblemente entre 16 a 80, nucleótidos consecutivos que son complementarios a un primer exón de un pre-ARNm de distrofina y donde se usa una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 8, preferiblemente entre 16 a 80, nucleótidos consecutivos que son complementarios a un segundo exón de dicho pre-ARNm de distrofina.
30 Dicho primer y dicho segundo exón pueden ser iguales.

[0049] En una forma de realización preferida, dicho primer y dicho segundo exón son separados en dicho pre-ARNm de distrofina por al menos un exón al que dicho oligonucleótido no es complementario.
35 Alternativamente, dicho primer y dicho segundo exón son adyacentes.

[0050] Es posible promover específicamente el salto de también los exones de intervención mediante una conexión entre los dos oligonucleótidos complementarios.
40 Por lo tanto, en una forma de realización, una extensión de nucleótidos complementaria a por lo menos dos exones de distrofina está separada por una fracción de conexión.
Al menos dos extensiones de nucleótidos son así enlazadas en esta forma de realización para formar una única molécula.

45 Además, se proporciona, por lo tanto, un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, de la divulgación que es complementario por lo menos a dos exones en un pre-ARNm de distrofina, dicho equivalente oligonucleótido o funcional que comprende al menos dos partes, donde una primera parte comprende un oligonucleótido que tiene al menos 8, preferiblemente entre 16 a 80, nucleótidos consecutivos que son complementarios a un primero de dichos al menos dos exones y donde una segunda parte comprende un oligonucleótido que tiene al menos 8, preferiblemente entre 16 a 80, nucleótidos consecutivos que son complementarios a un segundo exón en dicho pre-ARNm de distrofina.

50 La conexión puede ser a través de cualquier medio, pero es preferiblemente realizada a través de un enlace de nucleótidos.

En este último caso, el número de nucleótidos que no contienen un solapamiento entre uno u otro exón complementario pueden ser cero, pero es preferiblemente entre 4 a 40 nucleótidos.

La fracción de conexión puede ser cualquier tipo de fracción capaz de enlazar oligonucleótidos.

Preferiblemente, dicha fracción de conexión comprende al menos 4 nucleótidos de uracilo.

55 Actualmente, hay disponibles muchos compuestos diferentes que imitan las características de hibridación de los oligonucleótidos.

Tal compuesto, llamado aquí un equivalente funcional de un oligonucleótido, es también adecuado para la presente invención si tal equivalente comprende características de hibridación similares en cuanto al tipo, no necesariamente en cuanto a la cantidad.

60 Los equivalentes funcionales adecuados son mencionados anteriormente en esta descripción.

Tal y como se menciona, los oligonucleótidos de la invención no tienen que consistir en solo oligonucleótidos que contribuyan a la hibridación del exón objetivo.

Puede haber material adicional y/o nucleótidos añadidos.

65 [0051] El gen DMD es un gen grande, con muchos exones diferentes.

Considerando que el gen está localizado en el cromosoma X, en su mayoría son los niños los que son afectados, aunque las niñas también pueden ser afectadas por la enfermedad, ya que pueden recibir una copia mala del gen de ambos padres, o sufren una inactivación particularmente desviada del alelo funcional debido a una inactivación particularmente desviada del cromosoma X en sus células musculares.

5 La proteína es codificada por una pluralidad de exones (79) en un rango de al menos 2,4 Mb.

Los defectos pueden ocurrir en cualquier parte del gen DMD.

El salto de un exón particular o exones particulares puede, muy a menudo, suponer un ARNm reestructurado que codifica una proteína distrofina más corta de lo normal pero al menos parcialmente funcional.

10 Un problema práctico en el desarrollo de un medicamento basado en la tecnología del salto de exón es la pluralidad de mutaciones, que pueden suponer una deficiencia en la proteína distrofina funcional en la célula.

A pesar del hecho de que ya varias mutaciones se pueden corregir por el salto de un único exón, esta pluralidad de mutaciones requiere la generación de una serie de fármacos diferentes, ya que para diferentes mutaciones, diferentes exones necesitan ser saltados.

15 Una ventaja de un oligonucleótido o de una composición que comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes, como se define más adelante en este documento, capaces de inducir el salto de dos o más exones, es que se puede saltar más de un exón con un único fármaco.

Esta propiedad no es solo muy útil en la práctica por el hecho de que sólo un número limitado de fármacos necesita ser generado para tratar muchas mutaciones de DMD diferentes o de BMD particulares y graves.

20 Otra opción ahora abierta al experto en la técnica es seleccionar proteínas de distrofina reestructuradas particularmente funcionales y producir compuestos capaces de generar estas proteínas de distrofina preferidas.

A tales resultados finales preferidos se hace referencia además como distrofinas de fenotipo moderado.

[0052] Los rangos de dosis de oligonucleótidos según la invención son preferiblemente diseñados basándose en estudios de aumento de dosis en ensayos clínicos (uso in vivo) para los que existen rigurosos requisitos de protocolo.

25 Una molécula o un oligonucleótido tal y como se define aquí se puede usar en una dosis que oscila entre 0,1 y 20 mg/kg, preferiblemente 0,5 y 10 mg/kg.

En una forma de realización preferida, se usa una concentración de un oligonucleótido tal y como se define aquí, que oscila entre 0,1 nM y 1 µM.

30 Preferiblemente, este rango es para el uso in vitro en un modelo celular tal como células musculares o tejido muscular.

Más preferiblemente, la concentración usada oscila entre 0,3 a 400 nM, aún más preferiblemente entre 1 a 200 nM.

Si se usan varios oligonucleótidos, esta concentración o dosis puede referirse a la concentración total o dosis de oligonucleótidos o la concentración o dosis de cada oligonucleótido añadido.

35 [0053] Los rangos de concentración o dosis de oligonucleótido(s) como se dan arriba son concentraciones o dosis preferidas para usos in vitro o ex vivo.

40 La persona experta entenderá que dependiendo del/de los oligonucleótido(s) usado(s), la célula objetivo por ser tratada, el objetivo de gen y sus niveles de expresión, el usado medio y las condiciones de transfección e incubación, la concentración o dosis de oligonucleótido(s) usada pueden variar más y pueden necesitar ser más optimizados.

[0054] Un oligonucleótido tal y como se define aquí para un uso según la invención puede ser adecuado para administrarlo a una célula, tejido y/u órgano in vivo de individuos afectados por o con riesgo de desarrollar DMD o BMD, y se puede administrar in vivo, ex vivo o in vitro.

45 Dicho oligonucleótido puede ser administrado directa o indirectamente a una célula, tejido y/o un órgano in vivo de un individuo afectado por o con riesgo de desarrollar DMD o BMD, y se puede administrar directa o indirectamente in vivo, ex vivo o in vitro.

50 Como la distrofia muscular de Duchenne y de Becker tienen un fenotipo pronunciado en las células musculares, se prefiere que dichas células sean células musculares, y además se prefiere que dicho tejido sea un tejido muscular y/o además se prefiere que dicho órgano comprenda o consista en un tejido muscular.

Un órgano preferido es el corazón.

Preferiblemente, dichas células comprenden un gen que codifica una proteína distrofina mutante.

55 Preferiblemente, dichas células son las células de un individuo que padece DMD o BMD.

[0055] Un oligonucleótido de la invención puede ser administrado indirectamente usando medios adecuados conocidos en la técnica. Un oligonucleótido puede, por ejemplo, ser proporcionado para un individuo o una célula, tejido o órgano de dicho individuo en forma de un vector de expresión donde el vector de expresión codifica una transcripción que comprende dicho oligonucleótido.

60 El vector de expresión es preferiblemente introducido en una célula, tejido, órgano o individuo mediante un vehículo de entrega de gen.

En una forma de realización preferida, se proporciona un vector de expresión de base viral que incluye un casete de expresión o un casete de transcripción que acciona la expresión o transcripción de una molécula como se identifica aquí.

65 Un vehículo de entrega preferido es un vector viral tal como un vector de virus adeno-asociado (AAV), o un vector retroviral tal como un vector lentivirus^{4, 51, 52} y similares.

Además, los plásmidos, cromosomas artificiales, plásmidos adecuados para la recombinación homóloga objetivo y la integración en el genoma humano de células pueden ser adecuadamente aplicados para la entrega de un oligonucleótido tal y como se define aquí.

Para la presente invención se prefieren los vectores en los que transcripción es iniciada a partir de promotores PolIII, y/o en los que las transcripciones están en las fusiones de forma con transcripciones U1 o U7, que producen buenos resultados entregando transcripciones pequeñas.

Está dentro de la habilidad del técnico diseñar transcripciones adecuadas.

Las preferidas son transcripciones activas por PolIII.

Preferiblemente, en forma de una transcripción de fusión con una transcripción U1 o U7^{4, 51, 52}.

Tales fusiones se pueden generar como se describe^{53, 54}.

El oligonucleótido se puede entregar tal y como es.

Sin embargo, el oligonucleótido también puede ser codificado por el vector viral.

Típicamente, este está en forma de una transcripción de ARN que comprende la secuencia del oligonucleótido en una parte de la transcripción.

[0056] Las mejoras en medios para suministrar a un individuo o a una célula, tejido, órgano de dicho individuo un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo, son esperadas considerando el progreso que ya se ha conseguido hasta el momento.

Dichas mejoras futuras pueden, por supuesto, ser incorporadas para conseguir el efecto mencionado en la reestructuración de ARNm utilizando un método de la invención.

Un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo se puede entregar tal cual a un individuo, una célula, tejido u órgano de dicho individuo.

Cuando se administra un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo, se prefiere que un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo esté disuelto en una solución que es compatible con el método de entrega.

Para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal y/o intraventricular se prefiere que la solución sea una solución fisiológica.

Particularmente en la invención se prefiere el uso de un excipiente que ayudará en la entrega de cada uno de los constituyentes tal y como se define aquí a una célula y/o al interior de una célula, preferiblemente una célula muscular.

Se prefieren los excipientes capaces de formar complejos, nanopartículas, micelas, vesículas y/o liposomas que entregan cada constituyente tal y como se define aquí, complejos o retenidos en una vesícula o liposoma a través de una membrana celular.

Muchos de estos excipientes se conocen en la técnica. Los excipientes adecuados comprenden polietilenimina (PEI), o polímeros catiónicos similares, incluyendo polipropilenoimina o copolímeros de polietilenimina (PECs y derivados,

anfifilos sintéticos (SAINT-18), lipofectinTM, DOTAP y/o proteínas cápsidas virales que son capaces de autoensamblarse en partículas que pueden entregar cada constituyente tal y como se define aquí a una célula, preferiblemente una célula muscular.

Se ha observado que tales excipientes entregan eficazmente un oligonucleótido, tales como ácidos nucleicos antisentido, a una amplia variedad de células cultivadas, incluyendo células musculares.

Su elevado potencial de transfección se combina con una toxicidad baja a moderada en cuanto a la supervivencia total de la célula.

La facilidad de modificación estructural puede utilizarse para permitir otras modificaciones y el análisis de sus otras (en vivo) características de transferencia de ácido nucleico y toxicidad.

[0057] La lipofectina representa un ejemplo de un agente de transfección liposomal.

Consiste en dos componentes lipídicos, un lípido catiónico cloruro de N-[1-(2,3 dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) (comparar DOTAP, que es la sal de metilsulfato) y un lípido neutro de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). El componente neutro media la liberación intracelular.

Otro grupo de sistemas de entrega son las nanopartículas poliméricas.

[0058] Los policationes tales como dietilaminoetilaminoetil (DEAE)-dextrano, que son bien conocidos como reactivos de transfección de ADN, se pueden combinar con butilcianoacrilato (PBCA) y hexilcianoacrilato (PHCA) para formular nanopartículas catiónicas que pueden entregar cada constituyente tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido a través de membranas celulares al interior de células.

[0059] Además de estos materiales de nanopartículas comunes, la protamina de péptido catiónico ofrece un método alternativo para formular un oligonucleótido con coloides.

Este sistema de nanopartícula coloidal puede formar las llamadas partículas con base de protamina, que se pueden preparar mediante un proceso de autoensamblaje simple para empaquetar y mediar la liberación intracelular de un oligonucleótido.

La persona experta puede seleccionar y adaptar cualquiera de los anteriores u otros excipientes alternativos disponibles comercialmente y sistemas de entrega para empaquetar y entregar un oligonucleótido para usar en la presente invención para entregarlo para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne o de la distrofia muscular de Becker en seres humanos.

[0060] Además, un oligonucleótido podría estar enlazado de manera covalente o de manera no covalente a un ligando de objetivo específicamente diseñado para facilitar la absorción en la célula, citoplasma y/o su núcleo.

Tal ligando podría comprender (i) una célula de reconocimiento de compuestos (incluyendo pero no limitado a estructuras peptídicas), tejido o elementos específicos para el órgano que faciliten la absorción celular y/o (ii) un compuesto químico capaz de facilitar la absorción en células y/o la liberación intracelular de un oligonucleótido a partir de vesículas, por ejemplo endosomas o lisosomas.

[0061] Por lo tanto, en una forma de realización preferida, un oligonucleótido se formula en una composición o un medicamento o una composición, que dispone de al menos un excipiente y/o un ligando de objetivo para la entrega y/o un dispositivo de entrega del mismo a una célula y/o que aumenta su entrega intracelular.

Por consiguiente, la invención también abarca una composición farmacéuticamente aceptable que incluye un oligonucleótido y que comprende además al menos un excipiente y/o un ligando de objetivo para la entrega y/o un dispositivo de entrega de dicho oligonucleótido a una célula y/o que aumenta su entrega intracelular.

Debe entenderse que si una composición comprende un constituyente adicional, tal como un compuesto complementario como se define aquí más adelante, cada constituyente de la composición puede no estar formulado en una combinación o composición o preparación única.

Dependiendo de su identidad, la persona experta conocerá qué tipo de formulación es el más apropiado para cada constituyente tal y como se define aquí.

En una forma de realización preferida, la invención proporciona una composición o una preparación que está en la forma de un conjunto de partes que incluyen un oligonucleótido y otro compuesto complementario como se define aquí más adelante.

[0062] Un oligonucleótido preferido es para evitar o tratar la distrofia muscular de Becker (BMD) o la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en un individuo.

Un individuo, que puede ser tratado utilizando un oligonucleótido de la invención, puede haber sido diagnosticado ya con DMD o BMD.

Alternativamente, un individuo que puede ser tratado utilizando un oligonucleótido de la invención puede no haber sido diagnosticado todavía con DMD o BMD, pero puede ser un individuo con un riesgo aumentado de desarrollar DMD o BMD en el futuro dado su contexto genético.

Un individuo preferido es un ser humano.

Composición

[0063] En otro aspecto, se proporciona una composición que incluye un oligonucleótido tal y como se define aquí.

Preferiblemente, dicha composición comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes tal y como se define aquí.

Más preferiblemente, estos dos oligonucleótidos diferentes están diseñados para saltar dos o más exones distintos como se ha definido anteriormente en el presente documento para el salto multi-exón.

[0064] En una forma de realización preferida, dicha composición es preferiblemente una composición farmacéutica, dicha composición farmacéutica que comprende un portador adyuvante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables.

Tal composición farmacéutica puede comprender cualquier portador, carga, conservante, adyuvante, solubilizador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable que es también proporcionado.

Tal portador, carga, conservante, adyuvante, solubilizador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable puede por ejemplo encontrarse en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

Cada característica de dicha composición ha sido definida anteriormente en este documento.

[0065] Si se usan diferentes oligonucleótidos, la concentración o la dosis ya definida aquí puede referirse a la concentración o dosis total de todos los oligonucleótidos usados o la concentración o dosis de cada oligonucleótido usado o añadido.

Por lo tanto, en una forma de realización, se proporciona una composición donde cada cantidad o la cantidad total de oligonucleótido usado se dosifica en una cantidad que oscila entre 0,5 mg/kg y 10 mg/kg.

[0066] Una composición preferida comprende adicionalmente:

a) un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación del tejido muscular, y/o

b) un compuesto complementario para mejorar la función, integridad y/o supervivencia de la fibra muscular, y/o

c) un compuesto que muestra actividad de translectura.

[0067] Se ha descubierto sorprendentemente que la frecuencia de salto de un exón de distrofina de un pre-ARNm que comprende dicho exón, cuando se usa un oligonucleótido dirigido hacia el exón o a uno o ambos sitios de empalme de dicho exón, es mejorada si las células que expresan dicho pre-ARNm también están provistas de un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para la reducción de la inflamación del tejido muscular, y/o un compuesto complementario para mejorar la función, integridad y/o supervivencia de la fibra

muscular.

La frecuencia de salto mejorada también aumenta el nivel de proteína distrofina funcional producida en una célula muscular de un individuo con DMD o BMD.

- 5 [0068] Según la presente divulgación, incluso cuando una deficiencia de proteína distrofina ha sido restaurada en un paciente de DMD mediante la administración de un oligonucleótido de la invención, la presencia de inflamación de tejido y células musculares dañadas todavía sigue contribuyendo a los síntomas de la DMD.
 Por lo tanto, aunque la causa de la DMD - es decir una proteína distrofina disfuncional - se mitiga, el tratamiento de la DMD se mejora aún más mediante el uso adicional de un tratamiento complementario según la presente divulgación.
 10 Además, la presente divulgación proporciona el conocimiento de que una reducción de la inflamación no supone una reducción significativa de la absorción de AON por las células musculares.
 Esto es sorprendente porque, en general, la inflamación mejora el tráfico de las células, la sangre y otros compuestos.
 15 Como resultado, la absorción/entrega de AON también se ve mejorada durante inflamación.
 Por lo tanto, antes de la presente divulgación, se preveía que un tratamiento complementario que contrarrestara la inflamación implicaría el riesgo de influir negativamente en el tratamiento con AON.
 Esto, sin embargo, parece no ser el caso.
- 20 [0069] Un compuesto complementario para reducir la inflamación comprende cualquier tratamiento que sea capaz de reducir inflamación al menos en parte, preferiblemente inflamación provocada por células musculares dañadas.
 Dicho compuesto complementario es más preferiblemente capaz de reducir la inflamación de tejido muscular.
 La inflamación es preferiblemente evaluada mediante la detección de un aumento en el número de las células inmunitarias infiltrantes tales como neutrófilos y/o mastocitos y/o células dendríticas y/o linfocitos en el tejido muscular que se sospecha que es distrófico.
 25 Esta evaluación es preferiblemente realizada en secciones transversales de una biopsia⁵⁷ de tejido muscular que se sospecha que es distrófico después de haber teñido específicamente células inmunitarias según se han identificado anteriormente.
 La cuantificación se realiza preferiblemente bajo microscopio.
 30 La reducción de la inflamación es, por lo tanto, preferiblemente evaluada mediante la detección de una reducción en el número de células inmunitarias en una sección transversal de tejido muscular que se sospechada que es distrófico.
 La detección de una reducción preferiblemente significa que el número de al menos un tipo de células inmunitarias según se identifican arriba ha disminuido en al menos 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 30%, 40%,
 35 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con el número de una célula inmunológica correspondiente en un mismo individuo antes del tratamiento.
 De la forma más preferible, no se detectan ningunas células inmunitarias infiltrantes en secciones transversales de dicha biopsia.
- 40 [0070] Un compuesto complementario de la divulgación para mejorar la función, la integridad y/o la supervivencia de la fibra muscular comprende cualquier tratamiento que sea capaz de, hasta cierto punto, aumentar la función, la integridad y/o la supervivencia de la fibra muscular en comparación con otro situación similar en la que dicho compuesto complementario no está presente.
 La mejora de la función, la integridad y/o la supervivencia de la fibra muscular se puede evaluar utilizando al menos una de las siguientes pruebas: una reducción detectable de la creatina-cinasa en sangre, una reducción detectable de la necrosis de las fibras musculares en una sección transversal de biopsia de un músculo que se sospecha que es distrófico, y/o un aumento detectable de la homogeneidad del diámetro de las fibras musculares en una sección transversal de biopsia de un músculo que se sospecha que es distrófico.
 45 Cada una de estas pruebas es conocida por la persona experta.
- 50 [0071] La creatina-cinasa se puede detectar en sangre como se describe en 57.
 Una reducción detectable en la creatina-cinasa puede significar una reducción del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con la concentración de creatina-cinasa en un mismo individuo antes del tratamiento.
 55 [0072] Una reducción detectable de la necrosis de las fibras musculares es preferiblemente evaluada en una biopsia muscular, más preferiblemente como se describe en 57 usando secciones transversales de biopsia.
 Una reducción detectable de la necrosis puede ser una reducción del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del área en la que la necrosis ha sido identificada utilizando secciones transversales de biopsia.
 60 La reducción se mide por comparación a la necrosis evaluada en un mismo individuo antes del tratamiento.
- [0073] Un aumento detectable de la homogeneidad del diámetro de una fibra muscular es preferiblemente evaluado en una sección transversal de biopsia muscular, más preferiblemente como se describe en 57.
- 65 [0074] En una forma de realización de la divulgación, se usa un compuesto complementario para aumentar la renovación de las células musculares dañadas.

Un compuesto complementario para aumentar la renovación de células musculares dañadas comprende cualquier tratamiento que sea capaz al menos de inducir y/o aumentar la renovación de células musculares dañadas.

Las células musculares dañadas son células musculares que tienen una funcionalidad significativamente menos medible clínicamente que una célula muscular sana e intacta.

5 En ausencia de distrofina, la tensión mecánica lleva a roturas del sarcolema, lo que causa un flujo descontrolado de calcio en el interior de la fibra muscular, lo que activa así las proteasas activadas por calcio y la necrosis de las fibras, dando como resultado células musculares dañadas.

10 El aumento de la renovación de células musculares dañadas significa que las células musculares dañadas se descomponen y se eliminan más rápidamente en comparación con una situación en la que la renovación de células musculares dañadas no es aumentada.

La renovación de células musculares dañadas es preferiblemente evaluada en una biopsia muscular, más preferiblemente como se describe en 57 utilizando una sección transversal de una biopsia.

Un aumento detectable de la producción puede ser un aumento del 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del área en la que la renovación ha sido identificada utilizando una sección transversal de biopsia.

15 El aumento se mide por comparación a la renovación evaluada en un mismo individuo antes del tratamiento.

[0075] Sin desear limitarse a la teoría, se cree que el aumento de la renovación de células musculares es preferido porque reduce las respuestas inflamatorias.

20 [0076] Según la presente divulgación, una composición de la invención que comprende además un tratamiento complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular de un individuo, es especialmente adecuada para usar como medicamento.

25 Tal composición es incluso más capaz de paliar uno o varios síntoma(s) de la distrofia muscular de Duchenne o de la distrofia muscular de Becker en comparación con una combinación que no comprende dicho componente complementario.

Esta forma de realización también mejora la frecuencia del salto de un exón de distrofina de un pre-ARNm que comprende dicho exón, cuando se usa un oligonucleótido dirigido hacia el exón o hacia uno o ambos sitios de empalme de dicho exón.

30 La frecuencia del salto mejorada también aumenta el nivel de proteína distrofina funcional producido en una célula muscular de un individuo con DMD o BMD.

[0077] También se proporciona, por lo tanto, una composición que comprende además un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular en dicho individuo, para usar como medicamento, preferiblemente para tratar, prevenir o contrarrestar la DMD.

35 En una forma de realización, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD donde se forma una proteína distrofina muy corta o un ARNm o proteína distrofina alterado/a o truncado/a que no es lo suficientemente funcional.

40 [0078] El complemento compuesto preferido de la divulgación para reducir la inflamación incluye un esteroide, un inhibidor TNF α , una fuente de mIGF-1 y/o un antioxidante.

Sin embargo, cualquier otro compuesto capaz de reducir la inflamación tal y como se define aquí también está incluido en la presente divulgación.

Cada uno de estos compuestos se presenta ampliamente más adelante.

45 Cada uno de los compuestos ampliamente presentados se puede utilizar separadamente o en combinación entre sí y/o en combinación con uno o varios de los compuestos complementarios usados para mejorar la función, la integridad y/o supervivencia de la fibra muscular.

50 [0079] Además, en la divulgación, una composición que incluye un tratamiento complementario para mejorar la función, la integridad y/o la supervivencia de la fibra muscular en un individuo es especialmente adecuada para usar como medicamento, preferiblemente para tratar o prevenir la DMD.

Tal composición es aún más capaz de paliar uno o varios síntoma(s) de distrofia muscular de Duchenne en comparación con una composición que no comprende dicho compuesto complementario.

55 [0080] Los compuestos complementarios preferidos para mejorar la función, la integridad y/o la supervivencia de la fibra muscular incluyen un inhibidor de canal iónico, un inhibidor de proteasa y un bloqueador de receptor tipo I de la L-arginina y/o de la angiotensina II.

Sin embargo, cualquier otro compuesto capaz de mejorar la función, la integridad y/o la supervivencia de fibra muscular tal y como se define aquí también está incluido en la presente divulgación.

Cada uno de estos compuestos se presenta ampliamente más adelante.

60 Cada uno de los compuestos presentados ampliamente se puede utilizar separadamente o en combinación entre sí y/o en combinación con uno o varios de los compuestos complementarios usados para reducir la inflamación.

[0081] En una forma de realización particularmente preferida de la divulgación, una composición comprende además un esteroide.

65 Tal composición produce un alivio significativo de los síntomas de la DMD.

Esta forma de realización también mejora la frecuencia del salto de un exón de distrofina de un pre-ARNm que

comprende dicho exón, cuando se usa un oligonucleótido dirigido hacia el exón o hacia uno o ambos sitios de empalme de dicho exón.

La frecuencia del salto mejorada también aumenta el nivel de proteína distrofina funcional producida en una célula muscular de un individuo con DMD o BMD.

5 [0082] En una forma de realización de la divulgación, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.

10 [0083] Un esteroide es un lípido terpenoide caracterizado por un esqueleto de carbono con cuatro anillos fusionados, generalmente dispuesto en una forma 6-6-6-5.

Los esteroides varían por los grupos funcionales fijados a estos anillos y el estado de oxidación de los anillos.

Los esteroides incluyen hormonas y fármacos, que se usan normalmente para aliviar la hinchazón y la inflamación, como por ejemplo la prednisona, la dexametasona y la vitamina D.

15 [0084] Según la presente divulgación, los efectos adicionales del tratamiento complementario con esteroides para pacientes de DMD incluyen la reducción de la inflamación del tejido, la supresión de células citotóxicas y una homeostasis del calcio mejorada.

La mayoría de los resultados positivos se obtienen en niños más jóvenes.

20 Preferiblemente, el esteroide es un corticoesteroide, más preferiblemente, un glucocorticoesteroide.

Preferiblemente, los esteroides de prednisona tales como la prednisona, la prednisolona o el deflazacort se usan en una combinación según la invención ²¹.

Los rangos de dosis de un esteroide o de un glucocorticoesteroide para usarse en las aplicaciones terapéuticas como se describe en este documento se diseñan basándose en estudios de aumento de dosis en ensayos clínicos para que los que existen requisitos de protocolo rigurosos.

25 Las dosis usuales son de 0,5 - 1,0 mg/kg/día, preferiblemente de 0,75 mg/kg/día para la prednisona y la prednisolona, y de 0,4 - 1,4 mg/kg/día, preferiblemente de 0,9 mg/kg/día para el deflazacort.

30 [0085] En una forma de realización de la divulgación, un esteroide se administra a dicho individuo antes de la administración de una composición como se ha definido anteriormente en el presente documento.

En esta forma de realización, se prefiere que dicho esteroide se administre al menos un día, más preferiblemente al menos una semana, más preferiblemente al menos dos semanas, más preferiblemente al menos tres semanas antes de la administración de dicha composición.

35 [0086] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una combinación comprende además un inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citocina proinflamatoria que estimula la respuesta inflamatoria.

El bloqueo farmacológico de la actividad del TNF α con el anticuerpo de neutralización infliximab (Remicade) es de gran eficacia clínica para la reducción de los síntomas de las enfermedades inflamatorias.

40 En ratones mdx, tanto el infliximab como el etanercept retrasan y reducen la necrosis del músculo distrófico ^{24, 25}, con beneficios fisiológicos adicionales en la fuerza muscular, la función de los canales de cloruro y los niveles reducidos de la creatina-cinasa demostrados en ratones mdx adultos ejercitados tratados de manera crónica ²⁶.

Tales fármacos antiinflamatorios altamente específicos diseñados para usar en otras condiciones clínicas son alternativas atractivas al uso de esteroides para la DMD.

45 En una forma de realización, el uso de un inhibidor del TNF α se limita a periodos de crecimiento muscular intensivo en niños cuando el daño muscular y el deterioro son especialmente pronunciados.

[0087] También se proporciona una composición que comprende además un inhibidor del TNF α para usar como medicamento.

50 En una forma de realización, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.

Un inhibidor del TNF α preferido es una proteína de fusión dimérica que consiste en el dominio extracelular de unión al ligando del receptor p75 humano del TNF α enlazado a la porción Fc del IgG1 humano.

Un inhibidor del TNF α más preferido es el etanercept (Amgen, America) ²⁶.

55 Las dosis habitual de etanercept es aproximadamente de 0,2 mg/kg, preferiblemente aproximadamente 0,5 mg/kg dos veces a la semana.

La administración es preferiblemente subcutánea.

60 [0088] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una composición de la invención comprende además una fuente de mIGF-1.

Tal y como se define aquí, una fuente de IGF-1 preferiblemente abarca el propio mIGF-1, un compuesto capaz de mejorar la expresión y/o la actividad del mIGF-1.

Mejorar en este caso es sinónimo de aumentar.

La expresión de mIGF-1 es sinónima de cantidad de mIGF-1. El mIGF-1 favorece la regeneración de los músculos a través del aumento de la actividad de las células satélite, y la reduce inflamación y la fibrosis ²⁷.

65 La lesión local del músculo resulta en una expresión de mIGF-1 aumentada.

En ratones transgénicos con genes bIGF-1 extra, se observaron hipertrofia muscular y fibras musculares agrandadas ²⁷.

De forma similar, los ratones mdx transgénicos muestran una degeneración de la fibra muscular ²⁸.

La regulación del gen mIGF-1 y/o la administración de cantidades extra de proteína mIGF-1 o un equivalente funcional de la misma (especialmente la isoforma Ea de mIGF-1 [como se describe en 27, isoforma 4 de IGF-1 homólogo humano: SEC ID n.º: 577]) promueve así el efecto de otros tratamientos para DMD, preferiblemente genéticos, incluyendo el salto de exón inducido antisentido.

Los niveles de mIGF-1 adicionales en los ratones transgénicos anteriormente mencionados no inducen problemas cardíacos ni favorecen el cáncer, y no tienen efectos secundarios patológicos.

Como se ha mencionado antes, la cantidad de mIGF-1 es por ejemplo aumentada mediante la mejora de la expresión del gen mIGF-1 y/o mediante la administración de proteína mIGF-1 y/o un equivalente funcional de la misma (especialmente la isoforma Ea de mIGF-1 [como se describe en 27, isoforma 4 de IGF-1 homólogo humano: SEC ID n.º: 577]).

También se proporciona una composición de la invención que preferiblemente también comprende mIGF-1, un compuesto capaz de aumentar la expresión de mIGF-1 y/o la actividad de un mIGF-1, para usar como medicamento. Dicho medicamento es preferiblemente para el alivio de uno o varios síntoma(s) de DMD.

En una forma de realización, tal composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.

[0089] En el contexto de la divulgación, una cantidad o actividad aumentada de mIGF-1 se puede alcanzar mediante el aumento del nivel de expresión génica de un gen IGF-1, mediante el aumento de la cantidad de una proteína IGF-1 correspondiente y/o mediante el aumento de una actividad de una IGF1 proteína.

Una mIGF-1 proteína preferida ha sido definida anteriormente en este documento.

Se entiende que un aumento de una actividad de dicha proteína significa cualquier cambio detectable en una actividad biológica ejercida por dicha proteína o en el nivel estable de dicha proteína en comparación con dicha actividad o estado estable en un individuo que no ha sido tratado.

Cantidad o actividad de mIGF-1 aumentada es preferiblemente evaluada mediante la detección de una expresión aumentada del biomarcador de hipertrofia muscular GATA-2 (como se describe en 27).

[0090] El nivel de expresión génica preferiblemente es evaluado usando técnicas de biología molecular tradicionales tal como la PCR (tiempo real), matrices o análisis Northern.

Un nivel estable de una proteína se determina directamente por la cuantificación de la cantidad de una proteína.

La cuantificación de una cantidad de proteína se puede realizar mediante cualquier técnica conocida tal como la inmunoelectrotransferencia o el inmunoensayo utilizando un anticuerpo dirigido contra una proteína.

La persona experta entenderá que, alternativamente o en combinación con la cuantificación de un nivel de expresión génica y/o una proteína correspondiente, la cuantificación de un sustrato de una proteína correspondiente o de cualquier compuesto que se sabe que está asociado a una función o actividad de una proteína correspondiente o la cuantificación de dicha función o actividad de una proteína correspondiente utilizando una prueba específica se puede utilizar para valorar la alteración de un nivel de actividad o estado estable de una proteína.

[0091] En la invención, una actividad o nivel de estado estable de una dicha proteína se puede alterar en el nivel de la propia proteína, por ejemplo proporcionando una proteína a una célula de una fuente exógena.

[0092] Preferiblemente, un aumento o una sobreexpresión del nivel de expresión de dicho gen significa un aumento de al menos 5% del nivel de expresión de dicho gen utilizando matrices.

Más preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de dicho gen significa un aumento de al menos 10%, aún más preferiblemente al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 90%, al menos 150% o más.

En otra forma de realización preferida, un aumento del nivel de expresión de dicha proteína significa un aumento de al menos 5% del nivel de expresión de dicha proteína usando inmunoelectrotransferencia y/o usando ELISA o un ensayo adecuado.

Más preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una proteína significa un aumento de al menos 10%, aún más preferiblemente al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 90%, al menos 150% o más.

[0093] En otra forma de realización preferida, un aumento de una actividad de polipéptido significa un aumento de al menos el 5% de una actividad de polipéptido utilizando un ensayo adecuado.

Más preferiblemente, un aumento de una actividad de polipéptido significa un aumento de al menos 10%, aún más preferiblemente al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 90%, al menos 150% o más.

El aumento es preferiblemente evaluado mediante comparación con la actividad correspondiente en el individuo antes del tratamiento.

[0094] Una forma preferida de proporcionar una fuente de mIGF1 es introducir un transgen que codifica mIGF1, preferiblemente una isoforma Ea de mIGF-1 (como se describe en 27, isoforma 4 de IGF-1 homólogo humano: SEC ID n.º: 577), más preferiblemente en un vector AAV como se define más adelante en este documento.

Tal fuente de mIGF1 es expresada específicamente en el tejido muscular como se describe en ratones en 27.

[0095] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una composición comprende además un antioxidante.

5 El estrés oxidativo es un factor importante en la progresión de la DMD y favorece la inflamación y la fibrosis crónica²⁹.

Los productos más predominantes del estrés oxidativo, los lípidos peroxidados, aumentan una media de 35% en niños pacientes de Duchenne.

10 Los niveles aumentados de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa reducen la cantidad excesiva de radicales libres que causan estos efectos.

De hecho, un suplemento dietético Protandim® (LifeVantage) fue clínicamente evaluado y se descubrió que aumenta los niveles de superóxido-dismutasa (hasta 30%) y catalasa (hasta 54%), lo que, de hecho, inhibió significativamente la peroxidación de lípidos en 29 personas sanas³⁰.

15 Tal gestión eficaz del estrés oxidativo, por lo tanto, preserva la calidad muscular y promueve así el efecto positivo del tratamiento de la DMD.

La idebenona es otro antioxidante potente con una estructura química derivada de la coenzima natural Q10.

Protege las mitocondrias donde se genera el trifosfato de adenosina, ATP, por fosforilación oxidante.

La ausencia de distrofina en la DMD afecta negativamente a este proceso en el corazón, y probablemente también en el músculo esquelético.

20 La idebenona fue aplicada recientemente en ensayos clínicos en EEUU y Europa que demuestran la eficacia en aspectos neurológicos de la ataxia de Friedreich³¹.

Un ensayo clínico aleatorizado doble ciego controlado por placebo en fase IIa con Idebenona ha comenzado recientemente en Bélgica, incluyendo 21 niños pacientes de Duchenne de 8 a 16 años de edad.

El objetivo primario de este estudio es decidir el efecto de la Idebenona en la función del músculo cardíaco.

25 Además, diferentes pruebas será realizadas para detectar el beneficio funcional posible en la fuerza muscular de los pacientes.

Cuando es eficaz, la Idebenona es un compuesto complementario preferido para usar en una combinación según la presente divulgación para mejorar el efecto terapéutico del tratamiento de la DMD, especialmente en el corazón.

También se proporciona una composición que comprende además un antioxidante para usar como medicamento.

30 Dicho medicamento es preferiblemente para el alivio de uno o varios síntoma(s) de DMD.

En una forma de realización, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.

Dependiendo de la identidad del antioxidante, la persona experta sabrá qué cantidades son usadas preferiblemente.

Un antioxidante puede incluir bacósido, silimarina, curcumina y/o un polifenol.

35 Preferiblemente, un polifenol es o comprende 3-galato de epigallocatequina (EGCG).

Preferiblemente, un antioxidante es una mezcla de antioxidantes como el suplemento dietético Protandim® (LifeVantage).

Una cápsula diaria de 675mg de Protandim® comprende 150 mg de B. monniera (45% de bacósidos), 225mg de S. marianum (70-80% de silimarina), 150 mg de polvo de W. somnifera, 75mg de té verde (98% de polifenoles, donde 40 45% son de EGCG) y 75mg de cúrcuma (95% de curcumina).

[0096] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una composición comprende además un inhibidor de canal iónico.

45 La presencia de membranas musculares dañadas en la DMD altera el paso de iones de calcio al interior de las miofibras, y la homeostasis del calcio consecuentemente interrumpida activa muchas enzimas, por ejemplo proteasas, que causan daño adicional y necrosis muscular.

Los canales iónicos que contribuyen directamente a la acumulación patológica de calcio en el músculo distrófico son objetivos potenciales para los compuestos complementarios para tratar la DMD.

50 Existen pruebas de que algunos fármacos, tales como la pentoxifilina, bloquean los canales sensibles al ejercicio³² y de que los antibióticos que bloquean canales activados por extensión reducen la necrosis de la miofibra en ratones mdx y los niveles de creatina-cinasa en niños con DMD³³.

También se proporciona una composición que comprende además un inhibidor de canal iónico para usar como medicamento.

Dicho medicamento es preferiblemente para el alivio de uno o varios síntoma(s) de DMD.

55 En una forma de realización, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.

[0097] Preferiblemente se usa un inhibidor de canal iónico de la clase de las xantinas.

60 Más preferiblemente, dichas xantinas son derivados de metilxantinas, y de la forma más preferible, dichos derivados de metilxantina son elegidos del grupo consistente en pentoxifilina, furafilina, isofilina, propentofilina, pentofilina, teofilina, torbafilina, albifilina, enprofilina y derivados de las mismas.

Lo más preferido es el uso de pentoxifilina.

Los inhibidores de canal iónico de la clase de las xantinas mejoran la frecuencia del salto de un exón de distrofina de un pre-ARNm que comprende dicho exón, cuando se usa un oligonucleótido dirigido hacia el exón o a uno o ambos 65 sitios de empalme de dicho exón.

La frecuencia del salto mejorada también aumenta el nivel de proteína distrofina funcional producido en una célula

muscular de un individuo con DMD o BMD.

[0098] Dependiendo de la identidad del inhibidor de canal iónico, la persona experta sabrá qué cantidades son preferiblemente usadas.

5 Las dosis adecuadas de pentoxifilina están entre 1 mg/kg/día y 100 mg/kg/día, las dosis preferidas están entre 10 mg/kg/día y 50 mg/kg/día.
las dosis típicas usadas en seres humanos son de 20 mg/kg/día.

[0099] En una forma de realización de la divulgación, un inhibidor de canal iónico se administra a dicho individuo antes de la administración de una composición que incluye un oligonucleótido.

10 En esta forma de realización, se prefiere que dicho inhibidor de canal iónico se administre al menos un día, más preferiblemente al menos una semana, más preferiblemente al menos dos semanas, más preferiblemente al menos tres semanas antes de la administración de una composición que incluye un oligonucleótido.

[0100] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una composición comprende además un inhibidor de proteasa.

Las calpains son proteasas activadas por calcio que están aumentadas en el músculo distrófico y explican la degeneración de la miofibra.

20 Los inhibidores de calpaína, tales como la calpastatina, leupeptina³⁴, calpeptina, inhibidor de calpaína III, o PD150606 son, por lo tanto, aplicados para reducir el proceso de degeneración.

Un compuesto nuevo, BN 82270 (Ipsen) que posee una acción doble como inhibidor de calpaína y como antioxidante, aumentó la fuerza muscular, disminuyó la creatina-cinasa en suero y redujo la fibrosis reducida del diafragma del mdx, lo que indica un efecto terapéutico con este nuevo compuesto³⁵.

25 Otro compuesto de Leupeptina/Carnitina (Myodur) ha sido propuesto recientemente para ensayos clínicos en pacientes de DMD.

[0101] El MG132 es otro inhibidor proteasómico que se ha demostrado que reduce el daño de la membrana muscular y que mejora los signos histopatológicos de la distrofia muscular³⁶.

30 MG-132 (CBZ-leucil-leucil-leucinal) es un inhibidor proteasómico permeable a células ($K_i=4nM$), que inhibe la activación de NFkappaB al evitar la degradación de IkappaB ($IC_{50} = 3 \mu M$).

Además, es un aldehído péptido que inhibe la proteólisis mediada por ubiquitina al unirse e inactivar los proteasomas 20S y 26S.

Se ha observado que MG-132 inhibe la degradación proteasómica de proteínas asociadas a la distrofina en el modelo de ratón mdx distrófico³⁶.

35 Por lo tanto, este compuesto también es adecuado para usar como un compuesto farmacológico complementario para la DMD.

También se proporciona una composición que comprende además un inhibidor de proteasa para usar como un medicamento.

Dicho medicamento es preferiblemente para el alivio de uno o varios síntoma(s) de DMD.

40 En una forma de realización, dicha combinación se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.

Dependiendo de la identidad del inhibidor de proteasa, la persona experta sabrá qué cantidades son preferiblemente usadas.

[0102] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una composición comprende además L-arginina.

La falta de distrofina está asociada con la pérdida del complejo DGC en las membranas de fibra, incluyendo la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS).

La expresión de un transgen nNOS en ratones mdx reducen en gran medida el daño de la membrana muscular.

50 De forma similar, la administración de L-arginina (el sustrato para la óxido nítrico sintasa) aumentó la producción de NO y sobrerreguló la expresión de utrofina en ratones mdx.

Seis semanas de tratamiento con L-arginina mejoraron la patología muscular y disminuyeron la creatina-cinasa en ratones mdx³⁷.

El uso de L-arginina como otro constituyente en una composición de la invención no ha sido descrito.

[0103] También se proporciona una composición que comprende L-arginina para usar como medicamento.

Dicho medicamento es preferiblemente para el alivio de uno o varios síntoma(s) de DMD.

En una forma de realización, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.

[0104] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una composición comprende además losartán bloqueante de los receptores de tipo 1 de la angiotensina II, que normaliza la arquitectura, la reparación y la función muscular, como se muestra en el modelo de ratón mdx deficiente en distrofina²³.

También se proporciona una composición que comprende además losartán bloqueante de los receptores de tipo 1 de la angiotensina II para usar como medicamento.

65 Dicho medicamento es preferiblemente para el alivio de uno o varios síntoma(s) de DMD.

En una forma de realización, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de

BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional. Dependiendo de la identidad del bloqueante de los receptores de tipo 1 de la angiotensina II, la persona experta sabrá que cantidades son preferiblemente usadas.

- 5 [0105] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una composición comprende además un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina(ECA) , preferiblemente perindopril.
 Los inhibidores de la ECA son capaces de reducir la presión sanguínea.
 La iniciación temprana del tratamiento con perindopril se asocia a una mortalidad inferior en pacientes de DMD ²².
 También se proporciona una composición que comprende además un inhibidor de la ECA, preferiblemente
 10 perindopril, para usar como medicamento.
 Dicho medicamento es preferiblemente para el alivio de uno o varios síntoma(s) de DMD.
 En una forma de realización, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.
 Las dosis usuales de un inhibidor de la ECA, preferiblemente perindopril, son aproximadamente de 2 a 4 mg/día ²².
 15 En una forma de realización más preferida de la divulgación, un inhibidor de la ECA se combina con al menos uno de los compuestos complementarios previamente identificados.

- [0106] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una composición comprende además un compuesto que muestra una actividad de translectura.
 20 Un compuesto que muestra una actividad de translectura puede ser cualquier compuesto que sea capaz de suprimir un codón de terminación.
 Para el 20% de pacientes de DMD, la mutación en el gen de distrofina comprende una mutación puntual, de la cual 13% es una mutación sin sentido.
 Un compuesto que muestra una actividad de translectura o que es capaz de suprimir un codón de terminación es un
 25 compuesto que es capaz de proporcionar una cantidad aumentada de un ARNm o proteína distrofina funcional y/o una cantidad disminuida de un ARNm o proteína distrofina aberrante o truncada.
 Aumentado/a significa preferiblemente aumentado al menos un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más.
 Disminuido/a significa preferiblemente al menos un 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%,
 30 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más.
 Un aumento o una reducción de dicha proteína se evalúa preferiblemente en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo mediante comparación con la cantidad presente en dicho individuo antes del tratamiento con dicho compuesto que muestra una actividad de translectura.
 Alternativamente, la comparación se puede hacer con un tejido o célula muscular de dicho individuo que no todavía
 35 no ha sido tratada con dicho compuesto en caso de que el tratamiento sea local.
 La evaluación de una cantidad al nivel de las proteínas se realiza preferiblemente llevando a cabo el análisis de electrotransferencia.

- [0107] Los compuestos preferidos que muestran una actividad de translectura comprenden o consisten en
 40 aminoglicósidos, incluyendo, pero no limitados a, geneticina (G418), paromomicina, gentamicina y/o ácido 3-(5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoico, y derivados de los mismos (referencias 64, 65).

- [0108] Un compuesto más preferido que muestra una actividad de translectura comprende o consiste en PTC124™, y/o un equivalente funcional del mismo.
 45 PTC124™ es una marca registrada registrada de PTC Therapeutics, Inc.
 Sur Plainfield, Nueva Jersey. El ácido 3-(5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoico) también conocido como PTC124™ (referencias 16, 17) pertenece a una nueva clase de moléculas pequeñas que imita a concentraciones inferiores la actividad de translectura de la gentamicina (referencia 55).
 Un equivalente funcional del ácido 3-(5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoico) o de la gentamicina es un
 50 compuesto que es capaz de mostrar una actividad de translectura como se ha definido antes en el presente documento.
 De la forma más preferible, un compuesto que muestra una actividad de translectura comprende o consiste en gentamicina y/o ácido 3-(5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoico) también conocido como PTC124™.
 También se proporciona una composición que comprende además un compuesto que muestra una actividad de
 55 translectura, preferiblemente que comprende o consiste en gentamicina y/o ácido 3-(5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoico) para usar como medicamento.
 Dicho medicamento es preferiblemente para el alivio de uno o varios síntoma(s) de DMD.
 En una forma de realización, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.
 60 Las dosis usuales de un compuesto que muestra una actividad de translectura, preferiblemente ácido 3-(5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)benzoico) o de gentamicina oscilan entre 3 mg/kg/día a 200 mg/kg/día, las dosis preferidas están entre 10 mg/kg a 50 mg/kg al día o dos veces al día.
 En una forma de realización más preferida, un compuesto que muestra una actividad de translectura se combina con al menos uno de los compuestos complementarios previamente identificados.
 65

[0109] En otra forma de realización preferida de la divulgación, una composición comprende además un compuesto,

que es capaz de mejorar el salto de exón y/o inhibir el ensamblaje y/o empalme de espliceosoma.

Se ha observado que los compuestos químicos pequeños, tales como, por ejemplo, los derivados específicos del indol, inhiben selectivamente el ensamblaje y el empalme del espliceosoma³⁸, por ejemplo al interferir con la unión de proteínas ricas en serina y en arginina (SR) a sus potenciadores de empalme afines (ISE o ESE) y/o al interferir

5 con la unión de represores de empalme a secuencias silenciadoras (ESS o ISS). Estos compuestos son, por lo tanto, adecuados para ser aplicados como compuestos complementarios que mejoran el salto de exón.

También se proporciona una composición que comprende además un compuesto para mejorar el salto de exón y/o para inhibir el ensamblaje y/o el empalme del espliceosoma para usar como medicamento.

10 Dicho medicamento es preferiblemente para el alivio de uno o varios síntoma(s) de DMD.

En una forma de realización, dicha composición se usa para paliar uno o varios síntoma(s) de una forma grave de BMD en la que se forma una proteína distrofina muy corta que no es lo suficientemente funcional.

Dependiendo de la identidad del compuesto, que es capaz de mejorar el salto de exón y/o de inhibir el ensamblaje y/o empalme del espliceosoma, la persona experta sabrá qué cantidades son preferiblemente usadas.

15 En una forma de realización más preferida, un compuesto para mejorar el salto de exón y/o inhibir el ensamblaje y/o empalme del espliceosoma se combina con un inhibidor de la ECA y/o con cualquier compuesto complementario como se ha identificado en este documento anteriormente.

[0110] De este modo, la divulgación proporciona una composición que comprende además un compuesto complementario, donde dicho compuesto complementario comprende un esteroide, un inhibidor de la ECA (preferiblemente perindopril), losartán bloqueante de los receptores de tipo 1 de la angiotensina II, un inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), una fuente de mIGF-1, preferiblemente mIGF-1, un compuesto para mejorar la expresión de mIGF-1, un compuesto para mejorar la actividad de mIGF-1, un antioxidante, un inhibidor de canal iónico, un inhibidor de proteasa, L-arginina, un compuesto que muestra una actividad de translectura y/o que inhibe

20 el ensamblaje y/o empalme del espliceosoma.

[0111] En una forma de realización de la divulgación, también se proporciona a un individuo una proteína distrofina funcional que utiliza un vector, preferiblemente un vector viral, que comprende un gen de micro-mini-distrofina.

De la forma más preferible, se usa un vector viral adenoasociado recombinante (rAAV).

30 AAV es un parvovirus de ADN monocatenario que no es patógeno y que muestra un ciclo de vida dependiente del ayudante.

A diferencia de otros virus (adenovirus, retrovirus, y el virus del herpes simple), los vectores rAAV han demostrado ser muy eficaces para la transducción de músculo esquelético maduro.

35 La aplicación de rAAV en estudios tradicionales de "adición génica" de la DMD ha sido obstaculizada por sus límites restringidos de empaquetado (< 5 kb).

Por lo tanto, el rAAV se aplica preferiblemente a la entrega eficaz de un gen de micro o mini distrofina mucho más pequeño.

La administración de tal gen de micro o mini distrofina tiene como resultado la presencia de una proteína distrofina al menos parcialmente funcional.

40 Se hace referencia a 18-20.

[0112] Cada constituyente de una composición se puede administrar a un individuo en cualquier orden.

En una forma de realización, cada constituyente se administra simultáneamente (lo que significa que cada constituyente se administra dentro de un periodo de 10 horas, preferiblemente dentro de una hora).

45 Sin embargo, esto no es necesario.

En una forma de realización, al menos un compuesto complementario se administra a un individuo que lo necesite antes de la administración de un oligonucleótido.

Alternativamente, un oligonucleótido se administra a un individuo que lo necesite antes de la administración de al menos un compuesto complementario.

50

Uso

[0113] En otro aspecto, se proporciona el uso de un oligonucleótido o de una composición tal y como se define en este documento para la producción de un medicamento para prevenir o tratar la distrofia muscular de Duchenne o la distrofia muscular de Becker en un individuo.

55 Cada característica de dicho uso ha sido definida anteriormente en este documento.

Un tratamiento en un uso o en un método según la invención dura al menos una semana, al menos un mes, al menos varios meses, al menos un año, al menos 2, 3, 4, 5, 6 años o más.

60 Cada molécula u oligonucleótido o equivalente de los mismos, tal y como se define en el presente documento, para uso según la invención puede ser adecuado para la administración directa a una célula, tejido y/u órgano in vivo de individuos afectados por o con riesgo de desarrollar DMD o BMD, y se puede administrar directamente in vivo, ex vivo o in vitro.

La frecuencia de la administración de un, oligonucleótido composición, compuesto o compuesto complementario de la invención puede depender de diferentes parámetros, tales como la edad del paciente, la mutación del paciente, el número de moléculas (es decir, dosis), la formulación de dicha molécula.

65 La frecuencia puede oscilar entre al menos una vez cada dos semanas, o tres semanas o cuatro semanas o cinco

semanas o un período de tiempo más largo.

Método

5 [0114] En otro aspecto de la invención, se proporciona un método in vitro para el alivio de uno o varios síntoma(s) de la distrofia muscular de Duchenne o de la distrofia muscular de Becker en un individuo o para mitigar una o varias característica(s) de una célula miogénica o muscular de dicho individuo, método que comprende la administración a dicho individuo de un oligonucleótido o de una composición tal y como se define en este documento.

10 Además, se proporciona un método para el mejorar, inducir o promover el salto de un exón de un pre-ARNm de distrofina en una célula que expresa dicho pre-ARNm en un individuo que padece distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker, método que comprende administrar a dicho individuo un oligonucleótido o una composición tal y como se define en este documento.

15 Además, se proporciona un método para aumentar la producción de una proteína distrofina funcional y/o disminuir la producción de una proteína distrofina aberrante en una célula, dicha célula que comprende un pre-ARNm de un gen de distrofina que codifica una proteína distrofina aberrante, método que comprende proporcionar a dicha célula un oligonucleótido o composición de la invención y permitir la traducción de ARNm producido del empalme de dicho pre-ARNm.

En una forma de realización, dicho método se realiza in vitro, por ejemplo utilizando un cultivo celular.

20 Preferiblemente en la divulgación, dicho método es in vivo.

[0115] En este contexto, el aumento de la producción de una proteína distrofina funcional se ha definido anteriormente en este documento.

25 [0116] A menos que se indique lo contrario, cada forma de realización según se describe en este documento se puede combinar con otra forma de realización como se describe en este documento.

[0117] En este documento y en sus reivindicaciones, la palabra "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los elementos que van después de la palabra quedan incluidos, pero los artículos no específicamente mencionados no se excluyen.

30 Además la palabra "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en", con el significado de que un compuesto o compuesto complementario tal y como se define en este documento puede comprender componente(s) adicional(es) además de los específicamente identificados, dicho(s) componente(s) adicional(es) que no altera(n) la característica única de la invención.

35 [0118] Además, la referencia a un elemento con el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de ese elemento, a menos que el contexto requiera claramente que sólo haya uno de los elementos.

De este modo, el artículo indefinido "un" o "una" normalmente significa "al menos uno/a".

40 [0119] La palabra "aproximadamente" o "alrededor de" cuando se usa en asociación con un valor numérico (aproximadamente 10, alrededor de 10) preferiblemente significa que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos 1% del valor.

45 [0120] Cada forma de realización según se identifica en este documento se puede combinar a menos que se indique lo contrario.

[0121] La invención se explica más en los siguientes ejemplos.

Estos ejemplos no limitan el ámbito de la invención, sino que sólo sirven para clarificar la invención.

50 Breve descripción de los dibujos

[0122]

55 Figura 1. En los miotubos humanos de control, PS220 y PS305, ambos dirigidos a una secuencia idéntica dentro del exón 45, fueron directamente comparados para observar sus eficiencias de salto relativas. PS220 indujo de forma reproducible los niveles máximos de salto del exón 45 (hasta un 73%), mientras que con PS305 se obtuvieron niveles máximos de salto del exón 45 de hasta 46%. No se observó ningún salto del exón 45 en células no tratadas. (M: marcador de tamaño de ADN; NT: células no tratadas)

60 Figura 2. Gráfico que muestra los niveles relativos de salto del exón 45 de AON que contienen inosina evaluados por análisis RT-PCR. En los miotubos humanos de control, una serie de nuevos AON, todos dirigidos al exón 45 y que contienen una inosina para la sustitución de guanósina fueron evaluados para observar las eficiencias relativas del salto de exón 45 en comparación con PS220 y PS305 (ver figura 1). Todos los nuevos AON que contienen inosina fueron eficaces, aunque a niveles variables (entre 4% y 25%). PS220 indujo niveles máximos de salto del exón 45 (hasta 72%), mientras que con PS305 se obtuvieron niveles máximos de salto del exón 45 de hasta 63%. No se observó ningún salto del exón 45 en células no tratadas. (M: marcador de tamaño de ADN; NT: células no tratadas).

65

Ejemplos**Ejemplo 1**

5 Materiales y métodos

[0123] El diseño de los AON se basó (parcialmente) en estructuras secundarias abiertas solapadas del ARN del exón objetivo como predijo el programa m-fold, en sitios de unión de la proteína SR putativa (parcialmente) solapados como predijo el software ESEfinder.

10 Los AON fueron sintetizados por Prosensa Therapeutics B.V. (Leiden, Países Bajos), y contienen ARN de 2'-O-metilo y estructuras de fosfortioato (PS) en toda su longitud.

Cultivo de tejidos, transfección y análisis RT-PCR

15 [0124] Los cultivos de miotubos derivados de un individuo sano ("control humano") (ejemplos 1, 3, y 4; salto del exón 43, 50, 52) o de un paciente DMD que lleva una delección del exón 45 (ejemplo 2, salto de exón 46) fueron procesados como se ha descrito previamente (Aartsma-Rus et al., *Neuromuscul. Disord.* 2002; 12: S71-77 and *Hum Mol Genet* 2003; 12(8): 907-14).

Para la selección de los AON, se transfectaron cultivos de miotubos con 200nM para cada AON (PS220 y PS305).

20 Se usó el reactivo de transfección UNIFectylin (Prosensa Therapeutics BV, Países Bajos), con 2 µl de UNIFectylin por µg de AON.

Las eficiencias de los saltos de exón fueron determinados por análisis de RT-PCR anidada usando cebadores en los exones que flanquean el exón 45 objetivo.

Los fragmentos de la PCR fueron aislados de geles de agarosa para la verificación de la secuencia.

25 Para la cuantificación, los productos de la PCR fueron analizados utilizando el DNA 1000 LabChip Kit en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EEUU).

Resultados

30 Salto de exón 45 de DMD.

[0125] Dos AON, PS220 (SEC ID n.º: 76,5'-UUUGCCGCGUGCCCAAUGCCAUCUG-3') y PS305 (SEC ID n.º: 557,5'-UUUGCCICUGCCCAAUGCCAUCUG-3'), ambos dirigidos a una secuencia idéntica dentro del exón 45, fueron directamente comparados para observar sus eficiencias de salto relativas en los cultivos de miotubos sanos de control.

El análisis posterior RT-PCR y de secuencias de ARN aislado demostró que ambos AON eran, de hecho, capaces de inducir el salto del exón 45.

PS220, que consiste una extensión GCCGC, indujo de forma reproducible niveles máximos de salto del exón 45 (hasta 73%), como se muestra en la Figura 1.

40 Sin embargo, PS305, que es idéntico a PS220 pero que contiene una inosina para una sustitución de G en la posición 4 dentro de que extensión, también es eficaz y conduce a niveles de salto del exón 45 de hasta 46%.

No se observó ningún salto del exón 45 en células no tratadas (NT).

Ejemplo 2

45 Materiales y métodos

[0126] El diseño de los AON se basó en estructuras secundarias abiertas (parcialmente) solapadas del ARN del exón 45 objetivo como predijo el programa m-fold, en sitios de unión de proteína SR putativa (parcialmente) solapados como predijo el software ESEfinder.

50 Los AON fueron sintetizados por Prosensa Therapeutics B.V. (Leiden, Países Bajos), y contienen ARN de 2'-O-metilo, estructuras de fosfortioato (PS) en toda su longitud y una inosina para la sustitución de guanosina.

Cultivo de tejidos, transfección y análisis RT-PCR

55 [0127] Se procesaron cultivos de miotubos derivados de un individuo sano ("control humano") como se ha descrito previamente (Aartsma-Rus et al., *Neuromuscul. Disord.* 2002; 12: S71-77 and *Hum Mol Genet* 2003; 12(8): 907-14). Para la selección de AON, los cultivos de miotubos fueron transfectados con 200nM para cada AON.

60 Se usó el reactivo de transfección UNIFectylin (Prosensa Therapeutics BV, Países Bajos), con 2 µl de UNIFectylin por µg de AON.

Las eficiencias de los saltos de exón fueron determinados por análisis de RT-PCR anidada usando cebadores en los exones que flanquean el exón 45 objetivo.

Los fragmentos de la PCR fueron aislados de geles de agarosa para la verificación de la secuencia.

65 Para la cuantificación, los productos de la PCR fueron analizados utilizando el DNA 1000 LabChip Kit en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EEUU).

Resultados

Salto de exón 45 de DMD.

- 5 [0128] Una serie adicional de AON dirigidos al exón 45 y que contienen una sustitución de inosina fueron evaluados en cultivos de miotubos de control sanos para obtener las eficiencias de salto del exón 45, y fueron comparados directamente con PS220 (sin inosina; SEC ID n.º: 76) y PS305 (secuencia idéntica a PS220 pero con sustitución de inosina; SEC ID n.º: 557).
 El análisis posterior de secuencias y de RT-PCR de ARN aislado demostró que todos los AON nuevos (PS309 a PS316) fueron capaces de inducir el salto del exón 45 entre 4% (PS311) y 25% (PS310), como se muestra en la Figura 2.
 10 En comparación con PS220 y PS305, PS220 indujo niveles máximo de salto del exón 45 (hasta 72%). De los nuevos AON que contienen inosina, PS305 fue el más eficaz, mostrando niveles de salto de exón 45 de hasta 63%.
 15 No se observó ningún salto del exón 45 en células no tratadas (NT).

Referencias

[0129]

- 20 1. Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003;12(8):907-14.
- 25 2. Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Antisense-induced multi-exon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 2004;74(1):83-92.
3. Alter J, Lou F, Rabinowitz A, et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 2006;12(2):175-7.
- 30 4. Goyenvalle A, Vulin A, Fougerousse F, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004;306(5702):1796-9.
5. Lu QL, Mann CJ, Lou F, et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 2003;6:6.
- 35 6. Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, et al. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(1):198-203.
7. McClorey G, Fall AM, Moulton HM, et al. Induced dystrophin exon skipping in human muscle explants. *Neuromuscul Disord* 2006;16(9-10):583-90.
- 40 8. McClorey G, Moulton HM, Iversen PL, et al. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther* 2006;13(19):1373-81.
- 45 9. Pramono ZA, Takeshima Y, Alimsardjono H, Ishii A, Takeda S, Matsuo M. Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226(2):445-9.
- 50 10. Takeshima Y, Yagi M, Wada H, et al. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 2006;59(5):690-4.
11. van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001;10(15):1547-54.
- 55 12. Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, Janson A, den Dunnen J, van Ommen G, van Deutekom J. Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2002;12 Suppl:S71-S77.
- 60 13. Aartsma-Rus A, De Winter CL, Janson AA, et al. Functional analysis of 114 exon-internal AONs for targeted DMD exon skipping: indication for steric hindrance of SR protein binding sites. *Oligonucleotides* 2005;15(4):284-97.
- 65 14. Aartsma-Rus A, Janson AA, Heemskerk JA, CL de Winter, GJ Van Ommen, JC Van Deutekom. Therapeutic Modulation of DMD Splicing by Blocking Exonic Splicing Enhancer Sites with Antisense Oligonucleotides. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1082:74-6.

15. Aartsma-Rus A, Kaman WE, Weij R, den Dunnen JT, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Exploring the frontiers of therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy by double targeting within one or multiple exons. *Mol Ther* 2006;14(3):401-7.
- 5 16. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007;447(7140):87-91.
- 10 17. Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *Journal of clinical pharmacology* 2007;47(4):430-44.
- 15 18. Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(25):13714-9.
- 20 19. Fabb SA, Wells DJ, Serpente P, Dickson G. Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum Mol Genet* 2002;11(7):733-41.
- 25 20. Wang Z, Kuhr CS, Allen JM, et al. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther* 2007;15(6):1160-6.
- 30 21. Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;2.
- 35 22. Duboc D, Meune C, Pierre B, et al. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *American heart journal* 2007;154(3):596-602.
- 40 23. Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* 2007;13(2):204-10.
- 45 24. Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *Faseb J* 2004;18(6):676-82.
- 50 25. Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2006;16(9-10):591-602.
- 55 26. Pierno S, Nico B, Burdi R, et al. Role of tumour necrosis factor alpha, but not of cyclo-oxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach. *Neuropathology and applied neurobiology* 2007;33(3):344-59.
- 60 27. Musaro A, McCullagh K, Paul A, et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* 2001;27(2):195-200.
- 65 28. Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 2002;157(1):137-48.
29. Disatnik MH, Dhawan J, Yu Y, et al. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci* 1998;161(1):77-84.
30. Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free radical biology & medicine* 2006;40(2):341-7.
31. Hart PE, Lodi R, Rajagopalan B, et al. Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Archives of neurology* 2005;62(4):621-6.
32. Rolland JF, De Luca A, Burdi R, Andreetta F, Confalonieri P, Conte Camerino D. Overactivity of exercise-sensitive cation channels and their impaired modulation by IGF-1 in mdx native muscle fibers: beneficial effect of pentoxifylline. *Neurobiol Dis* 2006;24(3):466-74.
33. Whitehead NP, Streamer M, Lusambili LI, Sachs F, Allen DG. Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2006;16(12):845-54.
34. Badalamente MA, Stracher A. Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition. *Muscle Nerve* 2000;23(1):106-11.

35. Burdi R, Didonna MP, Pignol B, et al. First evaluation of the potential effectiveness in muscular dystrophy of a novel chimeric compound, BN 82270, acting as calpain-inhibitor and anti-oxidant. *Neuromuscul Disord* 2006;16(4):237-48.
- 5
36. Bonuccelli G, Sotgia F, Schubert W, et al. Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *Am J Pathol* 2003;163(4):1663-75.
- 10
37. Voisin V, Sebric C, Matecki S, et al. L-arginine improves dystrophic phenotype in mdx mice. *Neurobiol Dis* 2005;20(1):123-30.
- 15
38. Soret J, Bakkour N, Maire S, et al. Selective modification of alternative splicing by indole derivatives that target serine-arginine-rich protein splicing factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(24):8764-9.
- 20
39. Mann CJ, Honeyman K, McClorey G, Fletcher S, Wilton SD. Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *J Gene Med* 2002;4(6):644-54.
- 25
40. Graham IR, Hill VJ, Manoharan M, Inamati GB, Dickson G. Towards a therapeutic inhibition of dystrophin exon 23 splicing in mdx mouse muscle induced by antisense oligoribonucleotides (splicomers): target sequence optimisation using oligonucleotide arrays. *J Gene Med* 2004;6(10):1149-58.
- 30
41. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999;288(5):911-40.
- 35
42. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002;3(4):285-98.
- 40
43. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003;31(13):3568-71.
- 45
44. Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001;8(1):1-7.
- 50
45. Braasch DA, Corey DR. Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 2002;41(14):4503-10.
- 55
46. Elayadi AN, Corey DR. Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2(4):558-61.
- 60
47. Larsen HJ, Bentin T, Nielsen PE. Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489(1):159-66.
- 65
48. Summerton J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489(1):141-58.
49. Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7(3):187-95.
- 50
50. Wahlestedt C, Salmi P, Good L, et al. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(10):5633-8.
- 55
51. De Angelis FG, Sthandier O, Berarducci B, et al. Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(14):9456-61.
- 60
52. Denti MA, Rosa A, D'Antona G, et al. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum Gene Ther* 2006;17(5):565-74.
- 65
53. Gorman L, Suter D, Emerick V, Schumperli D, Kole R. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(9):4929-34.
54. Suter D, Tomasini R, Reber U, Gorman L, Kole R, Schumperli D. Double-target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta-thalassemic mutations. *Hum Mol Genet* 1999;8(13):2415-23.

55. Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, et al. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 2001;49(6):706-11.
- 5 56. Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, *Muscle Nerve*, 34: 135-144.
- 10 57. Hodgetts S., et al, (2006), *Neuromuscular Disorders*, 16: 591-602.
58. Manzur AY et al, (2008), Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy (review), Wiley publishers, The Cochrane collaboration.
- 15 59. Yokota T. et al., March 13th, 2009, e-publication: Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchennes dystrophy dogs. *Ann. Neurol.* 2009
60. Dorn and Kippenberger, *Curr Opin Mol Ther* 2008 10(1) 10-20
- 20 61. Cheng and Van Dyke, *Gene*. 1997 Sep 15;197(1-2):253-60
62. Macaya et al., *Biochemistry*. 1995 4;34(13):4478-92.
63. Suzuki et al., *Eur J Biochem*. 1999 , 260(3):855-6
- 25 64. Howard et al., *Ann Neurol* 2004 55(3): 422-6;
65. Nudelman et al., 2006, *Bioorg Med Chem Lett* 16(24), 6310-5

30 Listado de secuencias

[0130]

Secuencia de aminoácidos del gen DMD

SEQ ID NO 1:

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDLQDGRRLDLLEGL
 TGQKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNVLDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNIL
 HWQVKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIH
 SHRPDLFDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYIT
 SLFQVLPQQVSIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQMHYSQQITVSLAQQYERTSSP
 KPRFKSYAYTQAAYVTTSDPTRSPFPSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLDRYQTALIEV
 LSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGT
 GKLESEDEETEVEQEQMNLNLSRWECLRVASMEKQSNLHRVLMDLQNKLKLNDWLT
 KTEERTRKMEEEPLGPDLEDLKRQVQQHKVLQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVVDESSG
 DHATAALEEQKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCLFSAWLSEKE
 DAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVT
 QKTEAWLDNFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVTTREQILV
 KHAQEELPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNF
 SDLKEKVNAIEREKA EKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIE
 FCQLLSERLNWLEYQNNIAFYNQLEQEQMTTAEENWLKIQTPTTPEPTAISKQLKIC
 KQDEVNRLSGLPQIERLKIQSIALKEKQCGPMFLDADFVAFTNHFKQVFSQVQAREKEL
 QTIFDTPPMRYQETMSAIRTWVQQSETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQE
 QQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEEIEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMKNK
 LRKIQNHITLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQCRLVSDIQTITQPSLNSV
 NEGQKIKNEAPEFASRLETTELKELNTQWDHMCQQVYARKEALKGGLEKTVSLQKD
 LSEMHEWMTQAEEEEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKEAKVLLTESV
 NSVIAQAPPVAQEALKKELETLTNTYQWLC'TRLNGKCKTLEEVWACWHELLSYLEKAN
 KWLNEVEFKLKTENIPGAAEIESEVLDLENLMRHSNPNQIRILAQTLDGCVMD
 ELINEELETFNRSRWRELHEEAVRRQKLEEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYI
 ADKVDAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKNQKKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDVS
 MKFRFLQKPANFEQRLQESKMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQNLNHCVNLYKSL
 EVKSEVEMVIKTGRQIVQKKQ TENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLK
 LSRKMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSRAVEGMPSNLDSEVAWGKATQKIEKQKVH
 LKSITIEVGEALKTVLGGKKTLEDKLSLLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFD
 QNVDHITKWIIQADTLLDESEKKKPPQKEDVLKRLKAELNDRPKVDSTRDQAANLMA
 NRGDHCRLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQQ
 GVNKLEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNA
 LKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDREL
 QKKKEELNAVRRQAEGLSEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTV
 REETMMVMTEDMPLAISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQE
 ESLKNIKDSLQSSGRIDIIHSKKTAAALQSATPVERVKLQEALSQDFQWEKVNKMYKD
 RQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGI
 GQRQTVVRTL NATGEEIIQQSSKTDASILQEKLSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKN
 ILSEFQRDLNEFVLWLEADNIAIPLPGKEQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQL
 NETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLTQNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKK
 LEDLEEQLNHLLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFDVQETEIAVQAKQPDVEEILSKGQH
 LYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLQLELRAKQPD LAPGLTITIGASPTQTVTLVTQ
 PVVTKETAIKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLSLLDQVIKSQRVMVGDLEDI
 NEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRIERIQNQWDEVQ
 EHLQNRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAQVVLGQARAKLESWKEGPTYVDIAIKKITE
 TKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVVHMITENINASWRSIHKRVSER
 EAAL EETHRLQFPDLEKFLAWL TEAETTANVLQDATRKRERLLED SKGVKELMKQ
 WQDLQGEIEAHTDVYHNL DENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSELRKKSL
 NIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDDEL SRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFK

RELKTKPEVIMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPPPEERAQNVTRLLRQKQAEV
 NTEWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEATDELCLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLID
 SLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLQ
 VAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLLSTSVQGPWERAIKPNKVPYYINHETQTTTCWDHP
 KMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLSAACDALDQHNLKQNDQ
 PMDILQIINCLTTTYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMLNWLNVYDTGRTGRIRVLSFKTG
 IISLCKAHLEDKYRYLQVASS'TGFCDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSV
 RSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLRVAAAETAQHQAACNICKECPI
 IGFYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKKNK
 FRTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRI
 EHYASRLAEMENSNGSYLNDISIPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILIS
 LESEERGERILADLEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLSPPEMMP'TSPQSPRD
 AELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILEDHNKQLESQHLRRLQLEQPQAEAKVNGT'TVSS
 PSTSLQRS'DSSQPMLLRVVGSQTS'DSMGEEDLLSPPQDT'STGLEEVMEQLNNSFPSSRG
 RNTPGKPMREDTM

Exón 51 del gen DMD

| | | | |
|-----------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------|
| SEC ID Nº 2 | GUACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGG | SEC ID Nº 39 | GAGAUGGCAGUUUCCUAGUAACCA |
| SEC ID Nº 3 | UACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGC | SEC ID Nº 40 | AGAUGGCAGUUUCCUAGUAACCAC |
| SEC ID Nº 4 | ACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCA | SEC ID Nº 41 | GAUGGCAGUUUCCUAGUAACCACA |
| SEC ID Nº 5 | CCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAU | SEC ID Nº 42 | AUGGCAGUUUCCUAGUAACCACAG |
| SEC ID Nº 6 | CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUU | SEC ID Nº 43 | UGGCAGUUUCCUAGUAACCACAGG |
| SEC ID Nº 7 | UCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUU | SEC ID Nº 44 | GGCAGUUUCCUAGUAACCACAGGU |
| SEC ID NO 8 | CCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUC | SEC ID Nº 45 | GCAGUUUCCUAGUAACCACAGGUU |
| SEC ID NO 9 | CAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCU | SEC ID Nº 46 | CAGUUUCCUAGUAACCACAGGUUG |
| SEC ID Nº 10 | AACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUA | SEC ID Nº 47 | AGUUUCCUAGUAACCACAGGUUGU |
| SEC ID Nº 11 | ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG | SEC ID Nº 48 | GUUUCCUAGUAACCACAGGUUGUG |
| SEC ID Nº 12 | CAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGU | SEC ID Nº 49 | UUUCCUAGUAACCACAGGUUGUGU |
| SEC ID Nº 13 | AUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUU | SEC ID Nº 50 | UCCUAGUAACCACAGGUUGUGUC |
| SEC ID Nº 14 | UCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUU | SEC ID Nº 51 | UCCUAGUAACCACAGGUUGUGUCA |
| SEC ID Nº 15 | CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUG | SEC ID Nº 52 | CCUAGUAACCACAGGUUGUGUCAC |
| SEC ID Nº 16 | AAGGAAGAUCxGCAUUUCUAGUUUG G | SEC ID Nº 53 | CUUAGUAACCACAGGUUGUGUCACC |
| SEC ID Nº 17 | AGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGA | SEC ID Nº 54 | UUAGUAACCACAGGUUGUGUCACCA |
| SEC ID Nº 18 | GGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAG | SEC ID Nº 55 | UAGUAACCACAGGUUGUGUCACCAG |
| SEC ID Nº 19 | GAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGA | SEC ID Nº 56 | AGUAACCACAGGUUGUGUCACCAGA |
| SEC ID Nº 20 | AAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAU | SEC ID Nº 57 | GUAACCACAGGUUGUGUCACCAGAG |
| SEC ID Nº 21 | AGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG | SEC ID Nº 58 | UAACCACAGGUUGUGUCACCAGAGU |
| SEC ID | GAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGG | SEC ID | AACCACAGGUUGUGUCACCAGAGUA |

ES 2 593 836 T3

| | | | |
|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| Nº 22 | | Nº 59 | |
| SEC ID Nº 23 | AUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGC | SEC ID Nº 60 | ACCACAGGUUGUGUCACCAGAGUAA |
| SEC ID Nº 24 | UGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCA | SEC ID Nº 61 | CCACAGGUUGUGUCACCAGAGUAAC |
| SEC ID Nº 25 | GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAG | SEC ID Nº 62 | CACAGGUUGUGUCACCAGAGUAACA |
| SEC ID Nº 26 | GCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGU | SEC ID Nº 63 | ACAGGUUGUGUCACCAGAGUAACAG |
| SEC ID Nº 27 | CAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUU | SEC ID Nº 64 | CAGGUUGUGUCACCAGAGUAACAGU |
| SEC ID Nº 28 | AUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUU | SEC ID Nº 65 | AGGUUGUGUCACCAGAGUAACAGUC |
| SEC ID Nº 29 | UUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUC | SEC ID Nº 66 | GGUUGUGUCACCAGAGUAACAGUCU |
| SEC ID Nº 30 | UUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUCC | SEC ID Nº 67 | GUUGUGUCACCAGAGUAACAGUCUG |
| SEC ID Nº 31 | UCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUCCU | SEC ID Nº 68 | UUGUGUCACCAGAGUAACAGUCUGA |
| SEC ID Nº 32 | CUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUCCUU | SEC ID Nº 69 | UGUGUCACCAGAGUAACAGUCUGAG |
| SEC ID Nº 33 | UAGUUUGGAGAUGGCAGUUUCCUUA | SEC ID Nº 70 | GUGUCACCAGAGUAACAGUCUGAGU |
| SEC ID Nº 34 | AGUUUGGAGAUGGCAGUUUCCUJAG | SEC ID Nº 71 | UGUCACCAGAGUAACAGUCUGAGUA |
| SEC ID Nº 35 | GUUUGGAGAUGGCAGUUUCCUJAGU | SEC ID Nº 72 | GUCACCAGAGUAACAGUCUGAGUAG |
| SEC ID Nº 36 | UUUGGAGAUGGCAGUUUCCUJAGUA | SEC ID Nº 73 | UCACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGG |
| SEC ID Nº 37 | UUGGAGAUGGCAGUUUCCUJAGUAA | SEC ID Nº 74 | CACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGA |
| SEC ID Nº 38 | UGGAGAUGGCAGUUUCCUJAGUAA | SEC ID Nº 75 | ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAG |
| SEC ID Nº 539 | UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU | SEC ID Nº 548 | UCAAGGAAGAUGGCAUIUCU |
| SEC ID Nº 540 | UCAAIGAAGAUGGCAUUUCU | SEC ID Nº 549 | UCAAGGAAGAUGGCAUIUCU |
| SEC ID Nº 541 | UCAAGIAAGAUGGCAUUUCU | SEC ID Nº 550 | UCAAGGAAGAUGGCAUUUCI |
| SEC ID Nº 542 | UCAAGGAAIAGAUGGCAUUUCU | SEC ID Nº 551 | UCIAGGAAGAUGGCAUUUCU |
| SEC ID Nº 543 | UCAAGGAAGAUIGCAUUUCU | SEC ID Nº 552 | UCAIGGAAGAUGGCAUUUCU |
| SEC ID Nº 544 | UCAAGGAAGAUGICAUUUCU | SEC ID Nº 553 | UCAAGGIAGAUGGCAUUUCU |
| SEC ID Nº 545 | ICAAGGAAGAUGGCAUUUCU | SEC ID Nº 554 | UCAAGGAIGAUGGCAUUUCU |
| SEC ID Nº 546 | UCAAGGAAGAIGGCAUUUCU | SEC ID Nº 555 | UCAAGGAAGIUGGCAUUUCU |
| SEC ID Nº 547 | UCAAGGAAGAUGGCAIUUCU | SEC ID Nº 556 | UCAAGGAAGAUGGCAIUUCU |

Exón 45 del gen DMD

| | | | |
|------------------------------|-----------------------------------|---------------|----------------------------|
| SEC ID Nº 76 PS220 | UUUGCC <u>G</u> CUGCCCAAUGCCAUCUG | SEC ID Nº 109 | GUUGCAUUCAUGUUCUGACAACAG |
| SEC ID Nº 77 | AUUCA AUGUUCUGACAACAGUUUGC | SEC ID Nº 110 | UUGCAUUCAUGUUCUGACAACAGU |
| SEC ID Nº 78 | CCAGUUGCAUUCA AUGUUCUGACAA | SEC ID Nº 111 | UGCAUUCAUGUUCUGACAACAGUU |
| SEC ID Nº 79 | CAGUUGCAUUCA AUGUUCUGAC | SEC ID Nº 112 | GCAUUCA AUGUUCUGACAACAGUUU |

ES 2 593 836 T3

| | | | |
|------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------|
| SEC ID Nº 80 | AGUUGCAUUCAAGUUCUGA | SEC ID Nº 113 | CAUUCAAGUUCUGACAACAGUUUG |
| SEC ID Nº 81 | GAUUGCUGAAUUUUUCUJCC | SEC ID Nº 114 | AUUCAAGUUCUGACAACAGUUJGC |
| SEC ID Nº 82 | GAUUGCUGAAUUUUUCUJCCCCAG | SEC ID Nº 115 | UCAAGUUCUGACAACAGUUJGCCG |
| SEC ID Nº 83 | AUUGCUGAAUUUUUCUJCCCCAGU | SEC ID Nº 116 | CAAAGUUCUGACAACAGUUJGCCGC |
| SEC ID Nº 84 | UUGCUGAAUUUUUCUJCCCCAGUU | SEC ID Nº 117 | AAAGUUCUGACAACAGUUJGCCGCU |
| SEC ID Nº 85 | UGCUGAAUUUUUCUJCCCCAGUUG | SEC ID Nº 118 | AUGUUCUGACAACAGUUJGCCGCUG |
| SEC ID Nº 86 | GCUGAAUUUUUCUJCCCCAGUJGC | SEC ID Nº 119 | UGUUCUGACAACAGUUJGCCGCUGC |
| NO ID NO 87 | CUGAAUUUUUCUJCCCCAGUJGCA | SEC ID Nº 120 | GUUCUGACAACAGUUJGCCGCUGCC |
| SEC ID Nº 88 | UGAAUUUUUCUJCCCCAGUJGCAU | SEC ID Nº 121 | UUCUGACAACAGUUJGCCGCUGCCC |
| SEC ID Nº 89 | GAAUUUUUCUJCCCCAGUJGCAUU | SEC ID Nº 122 | UCUGACAACAGUUJGCCGCUGCCCA |
| SEC ID Nº 90 | AAUUUUUCUJCCCCAGUJGCAUUC | SEC ID Nº 123 | CUGACAACAGUUJGCCGCUGCCCAA |
| SEC ID Nº 91 | AUUUUUCUJCCCCAGUJGCAUUCA | SEC ID Nº 124 | UGACAACAGUUJGCCGCUGCCCAAU |
| SEC ID Nº 92 | UUUUUCUJCCCCAGUJGCAUUCAA | SEC ID Nº 125 | GACAACAGUUJGCCGCUGCCCAAUG |
| SEC ID Nº 93 | UAUUUCUJCCCCAGUJGCAUUCAAU | SEC ID Nº 126 | ACAACAGUUJGCCGCUGCCCAAUGC |
| SEC ID Nº 94 | AUUUCUJCCCCAGUJGCAUUCAAUG | SEC ID Nº 127 | CAACAGUUJGCCGCUGCCCAAUGCC |
| SEC ID Nº 95 | UUUCUJCCCCAGUJGCAUUCAAUGU | SEC ID Nº 128 | AACAGUUJGCCGCUGCCCAAUGCCA |
| SEC ID Nº 96 | UUCUJCCCCAGUJGCAUUCAAUGUU | SEC ID Nº 129 | ACAGUUJGCCGCUGCCCAAUGCCAU |
| SEC ID Nº 97 | UCUJCCCCAGUJGCAUUCAAUGUUC | SEC ID Nº 130 | CAGUUJGCCGCUGCCCAAUGCCAUC |
| SEC ID Nº 98 | CUJCCCCAGUJGCAUUCAAUGUUCU | SEC ID Nº 131 | AGUUJGCCGCUGCCCAAUGCCAUCC |
| SEC ID Nº 99 | UUCJCCCCAGUJGCAUUCAAUGUUCUG | SEC ID Nº 132 | GUUJGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCU |
| SEC ID Nº 100 | UCCJCCCCAGUJGCAUUCAAUGUUCUGA | SEC ID Nº 133 | UUJGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG |
| SEC ID Nº 101 | CCCAGUJGCAUUCAAUGUUCUGAC | SEC ID Nº 134 | UJGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGG |
| SEC ID Nº 102 | CCCAGUJGCAUUCAAUGUUCUGACA | SEC ID Nº 135 | UGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGA |
| SEC ID Nº 103 | CCAGUJGCAUUCAAUGUUCUGACAA | SEC ID Nº 136 | GCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAG |
| SEC ID Nº 104 | CAGUJGCAUUCAAUGUUCUGACAAC | SEC ID Nº 137 | CCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGU |
| SEC ID Nº 105 | AGUJGCAUUCAAUGUUCUGACAACA | SEC ID Nº 138 | CGCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUU |
| SEC ID Nº 106 | UCC UGU AGA AUA CUG GCA UC | SEC ID Nº 139 | UGUUUUJGAGGAUJGUGAA |
| SEC ID Nº 107 | UGCAGACCUCCUGCACCGCAGAUUC A | SEC ID Nº 140 | UGUUCUGACAACAGUUJGCCGCUGC CCAAUGCCAUCCUGG |
| SEC ID Nº 108 | UUGAGACCUCCUGCCACCGAGAGGC AGGUUC | SEC ID Nº 557 PS305 | UUUGCCICUGCCCAAUGCCAUCCUG |
| SEC ID | UUUGCCGCUICCCAAUGCCAUCCUG | SEC ID | UUUGCCGCUGCCCAIUGCCAUCCUG |

ES 2 593 836 T3

| | | | |
|---------------|---------------------------|---------------|---------------------------|
| Nº 558 | | Nº 566 | |
| SEC ID Nº 559 | UUUGCCGCUGCCCAAUICCAUCCUG | SEC ID Nº 567 | UUUGCCGCUGCCCAAUGCCIUCCUG |
| SEC ID Nº 560 | UUUICCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG | SEC ID Nº 568 | UUUICCCUGCCCAAUGCCAUCCUG |
| SEC ID Nº 561 | UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUI | SEC ID Nº 569 | UUUGCCGCUGCCCAAIGCCAUCCUG |
| SEC ID Nº 562 | IUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG | SEC ID Nº 570 | UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAICCG |
| SEC ID Nº 563 | UIUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG | SEC ID Nº 571 | UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCIG |
| SEC ID Nº 564 | UUIGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG | SEC ID Nº 572 | UUUGCCGCUGCCCIAUGCCAUCCUG |
| SEC ID Nº 565 | UUUGCCGCIGCCCAAUGCCAUCCUG | | |

Exón 53 del gen DMD

| | | | |
|---------------|---------------------------|---------------|--------------------------|
| SEC ID Nº 141 | CUCUGGCCUGUCCUAAGACCUGCUC | SEC ID Nº 165 | CAGCUUCUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 142 | UCUGGCCUGUCCUAAGACCUGCUCA | SEC ID Nº 166 | AGCUUCUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 143 | CUGGCCUGUCCUAAGACCUGCUCAG | SEC ID Nº 167 | GCUUCUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 144 | UGGCCUGUCCUAAGACCUGCUCAGC | SEC ID Nº 168 | CUUCUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 145 | GGCCUGUCCUAAGACCUGCUCAGCU | SEC ID Nº 169 | UUCUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 146 | GCCUGUCCUAAGACCUGCUCAGCUU | SEC ID Nº 170 | UCUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 147 | CCUGUCCUAAGACCUGCUCAGCUUC | SEC ID Nº 171 | CUUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 148 | CUGUCCUAAGACCUGCUCAGCUUCU | SEC ID Nº 172 | UUCUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 149 | UGUCCUAAGACCUGCUCAGCUUCUU | SEC ID Nº 173 | UCCUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 150 | GUCCUAAGACCUGCUCAGCUUCUUC | SEC ID Nº 174 | CCUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 151 | UCCUAAGACCUGCUCAGCUUCUUC | SEC ID Nº 175 | CUUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 152 | CCUAAGACCUGCUCAGCUUCUUCU | SEC ID Nº 176 | UUUCCUUAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 153 | CUAAGACCUGCUCAGCUUCUUCU | SEC ID Nº 177 | UAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 154 | UAAGACCUGCUCAGCUUCUUCUUA | SEC ID Nº 178 | AGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 155 | AAGACCUGCUCAGCUUCUUCUUC | SEC ID Nº 179 | GCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 156 | AGACCUGCUCAGCUUCUUCUUCU | SEC ID Nº 180 | CUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 157 | GACCUGCUCAGCUUCUUCUUCU | SEC ID Nº 181 | UCCUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 158 | ACCUGCUCAGCUUCUUCUUCU | SEC ID Nº 182 | UCCUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 159 | CCUGCUCAGCUUCUUCUUCU | SEC ID Nº 183 | CCUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 160 | CUGCUCAGCUUCUUCUUCU | SEC ID Nº 184 | CAGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 161 | UGCUCAGCUUCUUCUUCU | SEC ID Nº 185 | AGCUUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 162 | GCUCAGCUUCUUCUUCU | SEC ID Nº 186 | GCCUCCAGCCA |
| SEC ID Nº 163 | CUCAGCUUCUUCUUCU | SEC ID Nº 187 | CCUCCAGCCA |

ES 2 593 836 T3

| | | | |
|------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|
| SEC ID Nº 164 | UCAGCUUCUCCUAGCUUCCAGCC | SEC ID Nº 188 | CAUUGUGUUGAAUCCUUAACAUUU |
|------------------|-------------------------|------------------|--------------------------|

Exón 44 del gen DMD

| | | | |
|------------------|---------------------------------|------------------|---------------------------|
| SEC ID Nº 189 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUG | SEC ID Nº 214 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA |
| SEC ID Nº 190 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACU | SEC ID Nº 215 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA |
| SEC ID Nº 191 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUG | SEC ID Nº 216 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA |
| SEC ID Nº 192 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA | SEC ID Nº 217 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAU |
| SEC ID Nº 193 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA | SEC ID Nº 218 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUU |
| SEC ID Nº 194 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA | SEC ID Nº 219 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU |
| SEC ID Nº 195 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA | SEC ID Nº 220 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUUA |
| SEC ID Nº 196 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU | SEC ID Nº 221 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA |
| SEC ID Nº 197 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU | SEC ID Nº 222 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA |
| SEC ID Nº 198 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEC ID Nº 223 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA |
| SEC ID Nº 199 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEC ID Nº 224 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA |
| SEC ID Nº 200 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA | SEC ID Nº 225 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA |
| SEC ID Nº 201 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA | SEC ID Nº 226 | GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA |
| SEC ID Nº 202 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEC ID Nº 227 | CCAUUUGUAUUUAGCAUGUUC |
| SEC ID Nº 203 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEC ID Nº 228 | AGAUACCAUUUGUAUUUAGC |
| SEC ID Nº 204 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA | SEC ID Nº 229 | GCCAUUUCUCAACAGAUUCU |
| SEC ID Nº 205 | UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA A | SEC ID Nº 230 | GCCAUUUCUCAACAGAUUCUGUCA |
| SEC ID Nº 206 | CAGCUUCUGUUAGCCACUG | SEC ID Nº 231 | AUUCUCAGGAUUUGUGUCUUUC |
| SEC ID Nº 207 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAU | SEC ID Nº 232 | UCUCAGGAUUUGUGUCUUUC |
| SEC ID Nº 208 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEC ID Nº 233 | GUUCAGCUUCUGUUAGCC |
| SEC ID Nº 209 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU | SEC ID Nº 234 | CUGAUUAAAUAUCUUUAU C |
| SEC ID Nº 210 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA | SEC ID Nº 235 | GCCGCAUUUCUCAACAG |
| SEC ID Nº 211 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA | SEC ID Nº 236 | GUUUUAGCAUGUUC |
| SEC ID Nº 212 | AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEC ID Nº 237 | CAGGAUUUGUGUCUUUC |
| SEC ID Nº 213 | CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA | SEC ID Nº 575 | UCAICUUCUGUUAGCCACUG |
| SEC ID Nº 573 | UCAGCUUCUIUUAGCCACUG | SEC ID Nº 576 | UCAGCUUCUGUUAGCCACUI |
| SEC ID NO 574 | UCAGCUUCUGUUAICACUG | | |

5

Exón 46 del gen DMD

| | | | |
|--------|--------------------------|--------|---------------------------|
| SEC ID | GCUUUUCUUUAGUUGCUGCUCUUU | SEC ID | CCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAA |
|--------|--------------------------|--------|---------------------------|

ES 2 593 836 T3

| | | | |
|---------------|----------------------------|---------------|----------------------------|
| Nº 238 | | Nº 265 | |
| SEC ID Nº 239 | CUUUUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUU | SEC ID Nº 266 | CAGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAU |
| SEC ID Nº 240 | UUUUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUUC | SEC ID Nº 267 | AGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUG |
| SEC ID Nº 241 | UUUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUUCC | SEC ID Nº 268 | GGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGU |
| SEC ID Nº 242 | UUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUUCCA | SEC ID Nº 269 | GUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUU |
| SEC ID Nº 243 | UCUUUUAGUUGCUGCUCUUUUCCAG | SEC ID Nº 270 | UUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUA |
| SEC ID Nº 244 | CUUUUAGUUGCUGCUCUUUUCCAGG | SEC ID Nº 271 | UCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUUAU |
| SEC ID Nº 245 | UUUUAGUUGCUGCUCUUUUCCAGGU | SEC ID Nº 272 | CAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUUAUC |
| SEC ID Nº 246 | UUUAGUUGCUGCUCUUUUCCAGGUU | SEC ID Nº 273 | AAGUGGGAUACUAGCAAUGUUUAUCU |
| SEC ID Nº 247 | UUAGUUGCUGCUCUUUUCCAGGUUC | SEC ID Nº 274 | AGUGGGAUACUAGCAAUGUUUAUCUG |
| SEC ID Nº 248 | UAGUUGCUGCUCUUUUCCAGGUUCA | SEC ID Nº 275 | GUGGGAUACUAGCAAUGUUUAUCUGC |
| SEC ID Nº 249 | AGUUGCUGCUCUUUUCCAGGUUCAA | SEC ID Nº 276 | UGGGAUACUAGCAAUGUUUAUCUGCU |
| SEC ID Nº 250 | GUUGCUGCUCUUUUCCAGGUUCAAG | SEC ID Nº 277 | GGGAUACUAGCAAUGUUUAUCUGCUU |
| SEC ID Nº 251 | UUGCUGCUCUUUUCCAGGUUCAAGU | SEC ID Nº 278 | GGAUACUAGCAAUGUUUAUCUGCUUC |
| SEC ID Nº 252 | UGCUGCUCUUUUCCAGGUUCAAGUG | SEC ID Nº 279 | GAUACUAGCAAUGUUUAUCUGCUUCC |
| SEC ID Nº 253 | GCUGCUCUUUUCCAGGUUCAAGUGG | SEC ID Nº 280 | AUACUAGCAAUGUUUAUCUGCUUCCU |
| SEC ID Nº 254 | CUGCUCUUUUCCAGGUUCAAGUGGG | SEC ID Nº 281 | UACUAGCAAUGUUUAUCUGCUUCCUC |
| SEC ID Nº 255 | UGCUCUUUUCCAGGUUCAAGUGGGGA | SEC ID Nº 282 | ACUAGCAAUGUUUAUCUGCUUCCUCC |
| SEC ID Nº 256 | GCUCUUUUCCAGGUUCAAGUGGGAC | SEC ID Nº 283 | CUAGCAAUGUUUAUCUGCUUCCUCCA |
| SEC ID Nº 257 | CUCUUUUCCAGGUUCAAGUGGGUAU | SEC ID Nº 284 | UAGCAAUGUUUAUCUGCUUCCUCCAA |
| SEC ID Nº 258 | UCUUUUCCAGGUUCAACGUGGGAUAC | SEC ID Nº 285 | AGCAAUGUUUAUCUGCUUCCUCCAAC |
| SEC ID Nº 259 | UCUUUUCCAGGUUCAAGUGG | SEC ID Nº 286 | GCAAUGUUUAUCUGCUUCCUCCAACC |
| SEC ID Nº 260 | CUUUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACU | SEC ID Nº 287 | CAAUGUUUAUCUGCUUCCUCCAACCA |
| SEC ID Nº 261 | UUUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACUA | SEC ID Nº 288 | AAUGUUUAUCUGCUUCCUCCAACCAU |
| SEC ID Nº 262 | UUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACUAG | SEC ID Nº 289 | AUGUUUAUCUGCUUCCUCCAACCAUA |
| SEC ID Nº 263 | UUCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGC | SEC ID Nº 290 | UGUUUAUCUGCUUCCUCCAACCAUAA |
| SEC ID Nº 264 | UCCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGCA | | |

Exón 52 del gen DMD

| | | | |
|---------------|---------------------------|---------------|--------------------------|
| SEC ID Nº 291 | AGCCUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUU | SEC ID Nº 326 | UUGGGCAGCGGUAUGAGUUCUJCC |
| SEC ID Nº 292 | GCCUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUU | SEC ID Nº 327 | UGGGCAGCGGUAUGAGUUCUJCCA |
| SEC ID Nº 293 | CCUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUU | SEC ID Nº 328 | GGGCAGCGGUAUGAGUUCUJCCAA |
| SEC ID Nº 294 | CCUCUUGAUUGCUGGUCUUG | SEC ID Nº 329 | GGCAGCGGUAUGAGUUCUJCCAAC |

ES 2 593 836 T3

| | | | |
|------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------------|
| SEC ID Nº 295 | CUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUC | SEC ID Nº 330 | GCAGCGGUA AUGAGUUCUCCAACU |
| SEC ID Nº 296 | UCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCA | SEC ID Nº 331 | CAGCGGUA AUGAGUUCUCCAACUG |
| SEC ID Nº 297 | CUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCA | SEC ID Nº 332 | AGCGGUA AUGAGUUCUCCAACUGG |
| SEC ID Nº 298 | UUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAA | SEC ID Nº 333 | GCGGUA AUGAGUUCUCCAACUGGG |
| SEC ID Nº 299 | UGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAU | SEC ID Nº 334 | CGGUA AUGAGUUCUCCAACUGGGG |
| SEC ID Nº 300 | GAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAU | SEC ID Nº 335 | GGUA AUGAGUUCUCCAACUGGGGA |
| SEC ID Nº 301 | GAUUGCUGGUCUUGUUUUUC | SEC ID Nº 336 | GGUA AUGAGUUCUCCAACUGG |
| SEC ID Nº 302 | AUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAU | NO 337 | GUA AUGAGUUCUCCAACUGGGGAC |
| SEC ID Nº 303 | UUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUU | SEC ID Nº 338 | UA AUGAGUUCUCCAACUGGGGACG |
| SEC ID Nº 304 | UGCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUG | SEC ID Nº 339 | AAUGAGUUCUCCAACUGGGGACGC |
| SEC ID Nº 305 | GCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUGG | SEC ID Nº 340 | AUGAGUUCUCCAACUGGGGACGCC |
| SEC ID Nº 306 | CUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUGGG | SEC ID Nº 341 | UGAGUUCUCCAACUGGGGACGCCU |
| SEC ID Nº 307 | UGGUCUUGUUUUUCAAAUUUGGGC | SEC ID Nº 342 | GAGUUCUCCAACUGGGGACGCCUC |
| SEC ID Nº 308 | GGUCUUGUUUUUCAAAUUUGGGCA | SEC ID Nº 343 | AGUUCUCCAACUGGGGACGCCUCU |
| SEC ID Nº 309 | GUCUUGUUUUUCAAAUUUGGGCAG | SEC ID Nº 344 | GUUCUCCAACUGGGGACGCCUCUG |
| SEC ID Nº 310 | UCUUGUUUUUCAAAUUUGGGCAGC | SEC ID Nº 345 | UUCUCCAACUGGGGACGCCUCUGU |
| SEC ID Nº 311 | CUUGUUUUUCAAAUUUGGGCAGCG | SEC ID Nº 346 | UCUCCAACUGGGGACGCCUCUGUU |
| SEC ID Nº 312 | UUGUUUUUCAAAUUUGGGCAGCGG | SEC ID Nº 347 | CUCCAACUGGGGACGCCUCUGUUC |
| SEC ID Nº 313 | UGUUUUUCAAAUUUGGGCAGCGGU | SEC ID Nº 348 | UCCAACUGGGGACGCCUCUGUUC |
| SEC ID Nº 314 | GUUUUUUCAAAUUUGGGCAGCGGUA | SEC ID Nº 349 | UCCAACUGGGGACGCCUCUGUCCA |
| SEC ID Nº 315 | UUUUUCAAAUUUGGGCAGCGGUAA | SEC ID Nº 350 | CCAACUGGGGACGCCUCUGUCCAA |
| SEC ID Nº 316 | UUUUCAAAUUUGGGCAGCGGUAAU | SEC ID Nº 351 | CAACUGGGGACGCCUCUGUCCAAA |
| SEC ID Nº 317 | UUUCAAAUUUGGGCAGCGGUAAUC G | SEC ID Nº 352 | AACUGGGGACGCCUCUGUCCAAA |
| SEC ID Nº 318 | UUCAAAUUUGGGCAGCGGUAAUGA | SEC ID Nº 353 | ACUGGGGACGCCUCUGUCCAAA C |
| SEC ID Nº 319 | UCAAAUUUGGGCAGCGGUAAUGAG | SEC ID Nº 354 | CUGGGGACGCCUCUGUCCAAAUCC |
| SEC ID Nº 320 | CAAAUUUGGGCAGCGGUAAUGAGU | SEC ID Nº 355 | UGGGGACGCCUCUGUCCAAAUCCU |
| SEC ID Nº 321 | AAUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUU | SEC ID Nº 356 | GGGGACGCCUCUGUCCAAAUCCUG |
| SEC ID Nº 322 | AAUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUC | SEC ID Nº 357 | GGGACGCCUCUGUCCAAAUCCUGC |
| SEC ID Nº 323 | AUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUCU | SEC ID Nº 358 | GGACGCCUCUGUCCAAAUCCUGCA |
| SEC ID Nº 324 | UUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUCUU | SEC ID Nº 359 | GACGCCUCUGUCCAAAUCCUGCAU |
| SEC ID Nº 325 | UUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUCUUC | | |

ES 2 593 836 T3

Exón 50 del gen DMD

| | | | |
|------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|
| SEC ID Nº 360 | CCAAUAGUGGUCAGUCCAGGAGCUA | SEC ID Nº 386 | CUAGGUCAGGCUGCUUUGCCCUCAG |
| SEC ID Nº 361 | CAAUAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAG | SEC ID Nº 387 | UAGGUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGC |
| SEC ID Nº 362 | AAUAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGG | SEC ID Nº 388 | AGGUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCU |
| SEC ID Nº 363 | AUAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGU | SEC ID Nº 389 | GGUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUC |
| SEC ID Nº 364 | AUAGUGGUCAGUCCAGGAGCU | SEC ID Nº 390 | GUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCU |
| SEC ID Nº 365 | UAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGU C | SEC ID Nº 391 | UCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCU U |
| SEC ID Nº 366 | AGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGUCA | SEC ID Nº 392 | CAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUU G |
| SEC ID Nº 367 | GUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGUCA G | SEC ID Nº 393 | AGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUG A |
| SEC ID Nº 368 | UGGUCAGUCCAGGAGCUAGGUCAG G | SEC ID Nº 394 | GGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGA A |
| SEC ID Nº 369 | GGUCAGUCCAGGAGCUAGGUCAGG C | SEC ID Nº 395 | GCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAA G |
| SEC ID Nº 370 | GUCAGUCCAGGAGCUAGGUCAGGC U | SEC ID Nº 396 | CUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGU |
| SEC ID Nº 371 | UCAGUCCAGGAGCUAGGUCAGGCU G | SEC ID Nº 397 | UGC UUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUA |
| SEC ID Nº 372 | CAGUCCAGGAGCUAGGUCAGGCUG C | SEC ID Nº 398 | GCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAA |
| SEC ID Nº 373 | AGUCCAGGAGCUAGGUCAGGCUGC U | SEC ID Nº 399 | CUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAA |
| SEC ID Nº 374 | GUCCAGGAGCUAGGUCAGGCUGCU U | SEC ID Nº 400 | UUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAAC |
| SEC ID Nº 375 | UCCAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUU U | SEC ID Nº 401 | UUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAACG |
| NO 376 | CCAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUU G | SEC ID Nº 402 | UGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAACGG |
| SEC ID Nº 377 | CAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUG C | SEC ID Nº 403 | GCCCUCAGCUCUUGAAGUAAACGGU |
| SEC ID Nº 378 | AGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGC C | SEC ID Nº 404 | CCCUCAGCUCUUGAAGUAAACGGUU |
| SEC ID Nº 379 | GGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGCC C | SEC ID Nº 405 | CCUCAGCUCUUGAAGUAAAC |
| SEC ID Nº 380 | GAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGCCC U | SEC ID Nº 406 | CCUCAGCUCUUGAAGUAAACG |
| SEC ID Nº 381 | AGCUAGGUCAGGCUGCUUUGCCCU C | SEC ID Nº 407 | CUCAGCUCUUGAAGUAAACG |
| SEC ID Nº 382 | GCUAGGUCAGGCUGCUUUGCCCUC A | SEC ID NO 408 | CCUCAGCUCUUGAAGUAAACGGUUU |
| SEC ID Nº 383 | CUCAGCUCUUGAAGUAAACGGUUUA | SEC ID Nº 409 | UCAGCUCUUGAAGUAAACGGUUUAC |
| SEC ID Nº 384 | CAGCUCUUGAAGUAAACGGUUUACC | SEC ID Nº 410 | AGCUCUUGAAGUAAACGGUUUACCG |
| SEC ID Nº 385 | GCUCUUGAAGUAAACGGUUUACCGC | SEC ID Nº 411 | CUCUUGAAGUAAACGGUUUACCGCC |

Exón 43 del gen DMD

| | | | |
|------------------|-------------------------------|------------------|---------------------------|
| SEC ID Nº 412 | CCACAGGCGUUGCACUUUGCAAUG C | SEC ID Nº 443 | UCUUCUUGC UAUGAAUAAUGUCAU |
| SEC ID Nº 413 | CACAGGCGUUGCACUUUGCAAUGC U | SEC ID Nº 444 | CUUCUUGC UAUGAAUAAUGUCAUC |
| SEC ID Nº 414 | ACAGGCGUUGCACUUUGCAAUGCU G | SEC ID Nº 445 | UUCUUGC UAUGAAUAAUGUCAUCC |
| SEC ID Nº 415 | CAGGCGUUGCACUUUGCAAUGCUG C | SEC ID Nº 446 | UCUUGC UAUGAAUAAUGUCAUCCG |

ES 2 593 836 T3

| | | | |
|------------------|-------------------------------|------------------|--------------------------------|
| SEC ID Nº 416 | AGGCGUUGCACUUUGCAAUGCUGC U | SEC ID Nº 447 | CUUGCUAUGAAUAAUGUCAAUCCGA |
| SEC ID Nº 417 | GGCGUUGCACUUUGCAAUGCUGCU G | SEC ID Nº 448 | UUGCUAUGAAUAAUGUCAAUCCGAC |
| SEC ID Nº 418 | GCGUUGCACUUUGCAAUGCUGCUG U | SEC ID Nº 449 | UGCUAUGAAUAAUGUCAAUCCGACC |
| SEC ID Nº 419 | CGUUGCACUUUGCAAUGCUGCUGU C | SEC ID Nº 450 | GCUAUGAAUAAUGUCAAUCCGACCU |
| SEC ID Nº 420 | CGUUGCACUUUGCAAUGCUGCUG C | SEC ID Nº 451 | CUAUGAAUAAUGUCAAUCCGACCUG |
| SEC ID Nº 421 | GUUGCACUUUGCAAUGCUGCUGUC U | SEC ID Nº 452 | UAUGAAUAAUGUCAAUCCGACCUGA |
| SEC ID Nº 422 | UUGCACUUUGCAAUGCUGCUGUCU U | SEC ID Nº 453 | AUGAAUAAUGUCAAUCCGACCUGAG |
| SEC ID Nº 423 | UGCACUUUGCAAUGCUGCUGUCUU C | SEC ID Nº 454 | UGAAUAAUGUCAAUCCGACCUGAGC |
| SEC ID Nº 424 | GCACUUUGCAAUGCUGCUGUCUUC U | SEC ID Nº 455 | GAAUAAUGUCAAUCCGACCUGAGCU |
| SEC ID Nº 425 | CACUUUGCAAUGCUGCUGUCUUCU U | SEC ID Nº 456 | AAUAAUGUCAAUCCGACCUGAGCUU |
| SEC ID Nº 426 | ACUUUGCAAUGCUGCUGUCUUCUU G | SEC ID Nº 457 | AUAAUGUCAAUCCGACCUGAGCUUU |
| SEC ID Nº 427 | CUUUGCAAUGCUGCUGUCUUCUUG C | SEC ID Nº 458 | UAAUGUCAAUCCGACCUGAGCUUUG |
| SEC ID Nº 428 | UUUGCAAUGCUGCUGUCUUCUUGC U | SEC ID Nº 459 | AAUGUCAAUCCGACCUGAGCUUUGU |
| SEC ID Nº 429 | UUGCAAUGCUGCUGUCUUCUUGC A | SEC ID Nº 460 | AUGUCAAUCCGACCUGAGCUUUGUU |
| SEC ID Nº 430 | UGCAAUGCUGCUGUCUUCUUGC U | SEC ID Nº 461 | UGUCAAUCCGACCUGAGCUUUGUUC G |
| SEC ID Nº 431 | GCAAUGCUGCUGUCUUCUUGC G | SEC ID Nº 462 | GUCAAUCCGACCUGAGCUUUGUUGU |
| SEC ID Nº 432 | CAAUGCUGCUGUCUUCUUGC A | SEC ID Nº 463 | UCAAUCCGACCUGAGCUUUGUUGUA |
| SEC ID Nº 433 | AAUGCUGCUGUCUUCUUGC A | SEC ID Nº 464 | CAAUCCGACCUGAGCUUUGUUGUAG |
| SEC ID Nº 434 | AUGCUGCUGUCUUCUUGC U | SEC ID Nº 465 | AAUCCGACCUGAGCUUUGUUGUAGA |
| SEC ID Nº 435 | UGCUGCUGUCUUCUUGC A | SEC ID Nº 466 | AUCCGACCUGAGCUUUGUUGUAGAC |
| SEC ID Nº 436 | GCUGCUGUCUUCUUGC A | SEC ID Nº 467 | UCCGACCUGAGCUUUGUUGUAGACU |
| SEC ID Nº 437 | CUGCUGUCUUCUUGC A | SEC ID Nº 468 | CCGACCUGAGCUUUGUUGUAGACUA |
| SEC ID Nº 438 | UGCUGUCUUCUUGC G | SEC ID Nº 469 | CGACCUGAGCUUUGUUGUAG |
| SEC ID Nº 439 | GCUGUCUUCUUGC U | SEC ID Nº 470 | CGACCUGAGCUUUGUUGUAGACUAU |
| SEC ID Nº 440 | CUGUCUUCUUGC U | SEC ID Nº 471 | GACCUGAGCUUUGUUGUAGACUAUC |
| SEC ID Nº 441 | UGUCUUCUUGC U | SEC ID Nº 472 | ACCUGAGCUUUGUUGUAGACUAUCA |
| SEC ID Nº 442 | GUCUUCUUGC U | SEC ID Nº 473 | CCUGA GCUUU GUUGU AGACU AUC |

| Exón 6 del gen DMD | | | |
|---------------------------|--------------------------------|------------------|--------------------------|
| SEC ID Nº 474 | CAUUUUUGACCUACAUGUGG | SEC ID Nº 479 | AUUUUUGACCUACAUGGGAAAG |
| SEC ID Nº 475 | UUUGACCUACAUGUGGAAAG | SEC ID Nº 480 | UACGAGUUGAUUGUCGGACCCAG |
| SEC ID Nº 476 | UACAUUUUUGACCUACAUGUGGAA AG | SEC ID Nº 481 | GUGGUCUCCUACCUAUGACUGUGG |

ES 2 593 836 T3

| | | | |
|----------------------------|-------------------------------------|---------------|---------------------------|
| SEC ID Nº 477 | GGUCUCCUUACCUAUGA | SEC ID Nº 482 | UGUCUCAGUAAUCUUCUACCUAU |
| SEC ID Nº 478 | UCUJACCUAUGACUUGGAUGAGA | | |
| Exón 7 del gen DMD | | | |
| SEC ID Nº 483 | UGCAUGUUCAGUCGUUGUGUGG | SEC ID Nº 485 | AUUUACCAACCUUCAGGAUCGAGUA |
| SEC ID Nº 484 | CACUJUCAGUCAAAUAGGUCUG G | SEC ID Nº 486 | GGCCUAAAACACAUACACAU |
| Exón 8 del gen DMD | | | |
| SEC ID Nº 487 | GAUAGGUGGUAUCAACAUCUGUAA | SEC ID Nº 490 | UGUUGUUGUUUAUGCUCAUU |
| SEC ID Nº 488 | GAUAGGUGGUAUCAACAUCUG | SEC ID Nº 491 | GUACAUUAAGAUGGACUUC |
| SEC ID Nº 489 | CUUCCUGGAUGGCUUGAAU | | |
| Exón 55 del gen DMD | | | |
| SEC ID Nº 492 | CUGUUGCAGUAAUCUJAGAG | SEC ID Nº 495 | UGCCAUUGUUUCAUCAGCUCUUU |
| SEC ID Nº 493 | UGCAGUAAUCUJAGAUUUC | SEC ID Nº 496 | UCCUGUAGGACAUUGGCAGU |
| SEC ID Nº 494 | GAGUCUUCUAGGAGCCUU | SEC ID Nº 497 | CUUGGAGUCUUCUAGGAGCC |
| Exón 2 del gen DMD | | | |
| SEC ID Nº 498 | CCAUUUUUGUGAAUGUUUUCUUUU GAACAUC | SEC ID Nº 500 | GAAAAUUGUGCAUUUACCCAUUUU |
| SEC ID Nº 499 | CCCAUUUUGUGAAUGUUUUCUUUU | SEC ID Nº 501 | UUGUGCAUUUACCCAUUUUGUG |
| Exón 11 del gen DMD | | | |
| SEC ID Nº 502 | CCCUGAGGCAUCCCAUCUUGAAU | SEC ID Nº 504 | CUUGAAUUUAGGAGAUUCAUCUG |
| SEC ID Nº 503 | AGGACUUCUUGCUUUGUUU | SEC ID Nº 505 | CAUCUUCUGAUAAUUUCCUGUU |
| Exón 17 del gen DMD | | | |
| SEC ID Nº 506 | CCAUCAGUUGUCUGUGUU | SEC ID | UAAUCUGCCUCUUCUUUUGG |
| SEC ID Nº 507 | UGACAGCCUGUGAAAUCUGUGAG | | |
| Exón 19 del gen DMD | | | |
| SEC ID Nº 509 | CAGCAGUAGUUGUCAUCUGC | SEC ID Nº 511 | |
| SEC ID Nº 510 | | SEC ID Nº 512 | UCUGCUGGCAUCUUGC |
| Exón 21 del gen DMD | | | |
| SEC ID Nº 513 | GCCGGUUGACUUCAUCCUGUGC | SEC ID Nº 516 | CUGCAUCCAGGAACAUGGGUCC |
| SEC ID Nº 514 | GUCUGCAUCCAGGAACAUGGGUC | SEC ID Nº 517 | GUUGAAGAUCUGAUAGCCGGUUGA |
| SEC ID Nº 515 | UACUUCUGUCUGUAGCUCUUUCU | | |
| Exón 57 del gen DMD | | | |

| | | | |
|----------------------------|--------------------------------|---------------|---------------------------|
| SEC ID N° 518 | UAGGUGCCUGCCGGCUU | SEC ID N° 520 | CUGAACUGCUGGAAAGUCGCC |
| SEC ID N° 519 | UUCAGCUGUAGCCACACC | SEC ID N° 521 | |
| Exón 59 del gen DMD | | | |
| SEC ID N° 522 | CAAUUUUUCCACUCAGUAUU | SEC ID N° 524 | UCCUCAGGAGGCAGCUCUAAAU |
| SEC ID N° 523 | UUGAAGUUCUGGAGUCUU | | |
| Exón 62 del gen DMD | | | |
| SEC ID N° 525 | UGGCUCUCUCCAGGG | NO 527 | GGGCACUUUGUUUGGCG |
| SEC ID N° 526 | GAGAUGGCUCUCUCCAGGACCCUG G | | |
| Exón 63 del gen DMD | | | |
| SEC ID N° 528 | GGUCCCAGCAAGUUGUUUG | SEC ID N° 530 | GUAGAGCUCUGUCAUUUUGGG |
| SEC ID N° 529 | UGGGAUGGUCCCAGCAAGUUGUUU G | | |
| Exón 65 del gen DMD | | | |
| SEC ID N° 531 | GCUCAAGAGAUCACUGCAAAAAAC | SEC ID N° 533 | UCUGCAGGAUAUCCAUGGGCUGGUC |
| SEC ID N° 532 | GCCAUACGUACGUAUCAUAAACAU UC | | |
| Exón 66 del gen DMD | | | |
| SEC ID N° 534 | GAUCCUCCUGUUCGUCCCUAUUA UG | | |
| Exón 69 del gen DMD | | | |
| SEC ID N° 535 | UGCUIUAGACUCCUGUACCUGAUA | | |
| Exón 75 del gen DMD | | | |
| SEC ID N° 536 | GGCGGCCUUUGUGUUGAC | SEC ID N° 538 | CCUUUAUGUUCGUGCUGCU |
| SEC ID N° 537 | GGACAGGCCUUUAUGUUCGUGCUG C | | |

Secuencia de 4 aminoácidos de la isoforma IGF-1 humana

[0131]

5 SEC ID N° 577:

MGKISSLPTQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYLALCLLTFITSSATAGPETLCGAELV
DALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLLEMYCAPLKPKSA
RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAKNKRYRM

LISTADO DE SECUENCIAS

10

[0132]

ES 2 593 836 T3

<110> Prosensa Technologies B.V.

<120> Oligonucleótido que comprende una inosina para tratar la DMD mediante el salto de exón

<130> P6024692PCT

<150> US 61/172,506

<151> 2009-04-24

<150> EP 09158731.1

<151> 2009-04-24

<160> 577

<170> versión de PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 3685

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp Val
1 5 10 15

Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser Lys Phe
20 25 30

Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln Asp Gly Arg
35 40 45

Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn Asn Val Asn Lys Ala
65 70 75 80

Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp Leu Val Asn Ile Gly Ser
85 90 95

Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp
100 105 110

Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met
115 120 125

Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val
130 135 140

Arg Gln Ser Thr Arg Asn Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr
145 150 155 160

ES 2 593 836 T3

Thr Ser Trp Ser Asp Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His
165 170 175

Arg Pro Asp Leu Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala
180 185 190

Thr Gln Arg Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly
195 200 205

Ile Glu Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp
210 215 220

Lys Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro
225 230 235 240

Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro Arg
245 250 255

Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His Gln Met
260 265 270

His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly Tyr Glu Arg
275 280 285

Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala Tyr Thr Gln Ala
290 295 300

Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser Pro Phe Pro Ser Gln
305 310 315 320

His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe Gly Ser Ser Leu Met Glu
325 330 335

Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu
340 345 350

Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile
355 360 365

Ser Asn Asp Val Glu Val Val Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly
370 375 380

Tyr Met Met Asp Leu Thr Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu
385 390 395 400

Gln Leu Gly Ser Lys Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu
405 410 415

ES 2 593 836 T3

Glu Thr Glu Val Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu
 420 425 430

Cys Leu Arg Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val
 435 440 445

Leu Met Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu
 450 455 460

Thr Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly
 465 470 475 480

Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val Leu
 485 490 495

Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu Thr His
 500 505 510

Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala Thr Ala Ala
 515 520 525

Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Gly Asp Arg Trp Ala Asn Ile Cys
 530 535 540

Arg Trp Thr Glu Asp Arg Trp Val Leu Leu Gln Asp Ile Leu Leu Lys
 545 550 555 560

Trp Gln Arg Leu Thr Glu Glu Gln Cys Leu Phe Ser Ala Trp Leu Ser
 565 570 575

Glu Lys Glu Asp Ala Val Asn Lys Ile His Thr Thr Gly Phe Lys Asp
 580 585 590

Gln Asn Glu Met Leu Ser Ser Leu Gln Lys Leu Ala Val Leu Lys Ala
 595 600 605

Asp Leu Glu Lys Lys Lys Gln Ser Met Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Lys
 610 615 620

Gln Asp Leu Leu Ser Thr Leu Lys Asn Lys Ser Val Thr Gln Lys Thr
 625 630 635 640

Glu Ala Trp Leu Asp Asn Phe Ala Arg Cys Trp Asp Asn Leu Val Gln
 645 650 655

Lys Leu Glu Lys Ser Thr Ala Gln Ile Ser Gln Ala Val Thr Thr Thr
 660 665 670

Gln Pro Ser Leu Thr Gln Thr Thr Val Met Glu Thr Val Thr Thr Val

ES 2 593 836 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|
| | | 675 | | | | | | 680 | | | | | | | 685 | | | |
| Thr | Thr | Arg | Glu | Gln | Ile | Leu | Val | Lys | His | Ala | Gln | Glu | Glu | Leu | Pro | | | |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | | | | |
| Pro | Pro | Pro | Pro | Gln | Lys | Lys | Arg | Gln | Ile | Thr | Val | Asp | Ser | Glu | Ile | | | |
| | 705 | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 | | | |
| Arg | Lys | Arg | Leu | Asp | Val | Asp | Ile | Thr | Glu | Leu | His | Ser | Trp | Ile | Thr | | | |
| | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | | | | |
| Arg | Ser | Glu | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Pro | Glu | Phe | Ala | Ile | Phe | Arg | Lys | | | |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | | | | |
| Glu | Gly | Asn | Phe | Ser | Asp | Leu | Lys | Glu | Lys | Val | Asn | Ala | Ile | Glu | Arg | | | |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | | | | |
| Glu | Lys | Ala | Glu | Lys | Phe | Arg | Lys | Leu | Gln | Asp | Ala | Ser | Arg | Ser | Ala | | | |
| | 770 | | | | | 775 | | | | | 780 | | | | | | | |
| Gln | Ala | Leu | Val | Glu | Gln | Met | Val | Asn | Glu | Gly | Val | Asn | Ala | Asp | Ser | | | |
| | 785 | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 | | | |
| Ile | Lys | Gln | Ala | Ser | Glu | Gln | Leu | Asn | Ser | Arg | Trp | Ile | Glu | Phe | Cys | | | |
| | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | 815 | | | | |
| Gln | Leu | Leu | Ser | Glu | Arg | Leu | Asn | Trp | Leu | Glu | Tyr | Gln | Asn | Asn | Ile | | | |
| | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | | | | |
| Ile | Ala | Phe | Tyr | Asn | Gln | Leu | Gln | Gln | Leu | Glu | Gln | Met | Thr | Thr | Thr | | | |
| | | 835 | | | | | 840 | | | | | 845 | | | | | | |
| Ala | Glu | Asn | Trp | Leu | Lys | Ile | Gln | Pro | Thr | Thr | Pro | Ser | Glu | Pro | Thr | | | |
| | 850 | | | | | 855 | | | | | 860 | | | | | | | |
| Ala | Ile | Lys | Ser | Gln | Leu | Lys | Ile | Cys | Lys | Asp | Glu | Val | Asn | Arg | Leu | | | |
| | 865 | | | | 870 | | | | | 875 | | | | | 880 | | | |
| Ser | Gly | Leu | Gln | Pro | Gln | Ile | Glu | Arg | Leu | Lys | Ile | Gln | Ser | Ile | Ala | | | |
| | | | | 885 | | | | | 890 | | | | | 895 | | | | |
| Leu | Lys | Glu | Lys | Gly | Gln | Gly | Pro | Met | Phe | Leu | Asp | Ala | Asp | Phe | Val | | | |
| | | | 900 | | | | | 905 | | | | | 910 | | | | | |
| Ala | Phe | Thr | Asn | His | Phe | Lys | Gln | Val | Phe | Ser | Asp | Val | Gln | Ala | Arg | | | |
| | | 915 | | | | | 920 | | | | | 925 | | | | | | |
| Glu | Lys | Glu | Leu | Gln | Thr | Ile | Phe | Asp | Thr | Leu | Pro | Pro | Met | Arg | Tyr | | | |
| | 930 | | | | | 935 | | | | | 940 | | | | | | | |

ES 2 593 836 T3

Gln Glu Thr Met Ser Ala Ile Arg Thr Trp Val Gln Gln Ser Glu Thr
945 950 955 960

Lys Leu Ser Ile Pro Gln Leu Ser Val Thr Asp Tyr Glu Ile Met Glu
965 970 975

Gln Arg Leu Gly Glu Leu Gln Ala Leu Gln Ser Ser Leu Gln Glu Gln
980 985 990

Gln Ser Gly Leu Tyr Tyr Leu Ser Thr Thr Val Lys Glu Met Ser Lys
995 1000 1005

Lys Ala Pro Ser Glu Ile Ser Arg Lys Tyr Gln Ser Glu Phe Glu
1010 1015 1020

Glu Ile Glu Gly Arg Trp Lys Lys Leu Ser Ser Gln Leu Val Glu
1025 1030 1035

His Cys Gln Lys Leu Glu Glu Gln Met Asn Lys Leu Arg Lys Ile
1040 1045 1050

Gln Asn His Ile Gln Thr Leu Lys Lys Trp Met Ala Glu Val Asp
1055 1060 1065

Val Phe Leu Lys Glu Glu Trp Pro Ala Leu Gly Asp Ser Glu Ile
1070 1075 1080

Leu Lys Lys Gln Leu Lys Gln Cys Arg Leu Leu Val Ser Asp Ile
1085 1090 1095

Gln Thr Ile Gln Pro Ser Leu Asn Ser Val Asn Glu Gly Gly Gln
1100 1105 1110

Lys Ile Lys Asn Glu Ala Glu Pro Glu Phe Ala Ser Arg Leu Glu
1115 1120 1125

Thr Glu Leu Lys Glu Leu Asn Thr Gln Trp Asp His Met Cys Gln
1130 1135 1140

Gln Val Tyr Ala Arg Lys Glu Ala Leu Lys Gly Gly Leu Glu Lys
1145 1150 1155

Thr Val Ser Leu Gln Lys Asp Leu Ser Glu Met His Glu Trp Met
1160 1165 1170

Thr Gln Ala Glu Glu Glu Tyr Leu Glu Arg Asp Phe Glu Tyr Lys
1175 1180 1185

ES 2 593 836 T3

Thr Pro Asp Glu Leu Gln Lys Ala Val Glu Glu Met Lys Arg Ala
 1190 1195 1200

Lys Glu Glu Ala Gln Gln Lys Glu Ala Lys Val Lys Leu Leu Thr
 1205 1210 1215

Glu Ser Val Asn Ser Val Ile Ala Gln Ala Pro Pro Val Ala Gln
 1220 1225 1230

Glu Ala Leu Lys Lys Glu Leu Glu Thr Leu Thr Thr Asn Tyr Gln
 1235 1240 1245

Trp Leu Cys Thr Arg Leu Asn Gly Lys Cys Lys Thr Leu Glu Glu
 1250 1255 1260

Val Trp Ala Cys Trp His Glu Leu Leu Ser Tyr Leu Glu Lys Ala
 1265 1270 1275

Asn Lys Trp Leu Asn Glu Val Glu Phe Lys Leu Lys Thr Thr Glu
 1280 1285 1290

Asn Ile Pro Gly Gly Ala Glu Glu Ile Ser Glu Val Leu Asp Ser
 1295 1300 1305

Leu Glu Asn Leu Met Arg His Ser Glu Asp Asn Pro Asn Gln Ile
 1310 1315 1320

Arg Ile Leu Ala Gln Thr Leu Thr Asp Gly Gly Val Met Asp Glu
 1325 1330 1335

Leu Ile Asn Glu Glu Leu Glu Thr Phe Asn Ser Arg Trp Arg Glu
 1340 1345 1350

Leu His Glu Glu Ala Val Arg Arg Gln Lys Leu Leu Glu Gln Ser
 1355 1360 1365

Ile Gln Ser Ala Gln Glu Thr Glu Lys Ser Leu His Leu Ile Gln
 1370 1375 1380

Glu Ser Leu Thr Phe Ile Asp Lys Gln Leu Ala Ala Tyr Ile Ala
 1385 1390 1395

Asp Lys Val Asp Ala Ala Gln Met Pro Gln Glu Ala Gln Lys Ile
 1400 1405 1410

Gln Ser Asp Leu Thr Ser His Glu Ile Ser Leu Glu Glu Met Lys
 1415 1420 1425

ES 2 593 836 T3

Lys His Asn Gln Gly Lys Glu Ala Ala Gln Arg Val Leu Ser Gln
 1430 1435 1440
 Ile Asp Val Ala Gln Lys Lys Leu Gln Asp Val Ser Met Lys Phe
 1445 1450 1455
 Arg Leu Phe Gln Lys Pro Ala Asn Phe Glu Gln Arg Leu Gln Glu
 1460 1465 1470
 Ser Lys Met Ile Leu Asp Glu Val Lys Met His Leu Pro Ala Leu
 1475 1480 1485
 Glu Thr Lys Ser Val Glu Gln Glu Val Val Gln Ser Gln Leu Asn
 1490 1495 1500
 His Cys Val Asn Leu Tyr Lys Ser Leu Ser Glu Val Lys Ser Glu
 1505 1510 1515
 Val Glu Met Val Ile Lys Thr Gly Arg Gln Ile Val Gln Lys Lys
 1520 1525 1530
 Gln Thr Glu Asn Pro Lys Glu Leu Asp Glu Arg Val Thr Ala Leu
 1535 1540 1545
 Lys Leu His Tyr Asn Glu Leu Gly Ala Lys Val Thr Glu Arg Lys
 1550 1555 1560
 Gln Gln Leu Glu Lys Cys Leu Lys Leu Ser Arg Lys Met Arg Lys
 1565 1570 1575
 Glu Met Asn Val Leu Thr Glu Trp Leu Ala Ala Thr Asp Met Glu
 1580 1585 1590
 Leu Thr Lys Arg Ser Ala Val Glu Gly Met Pro Ser Asn Leu Asp
 1595 1600 1605
 Ser Glu Val Ala Trp Gly Lys Ala Thr Gln Lys Glu Ile Glu Lys
 1610 1615 1620
 Gln Lys Val His Leu Lys Ser Ile Thr Glu Val Gly Glu Ala Leu
 1625 1630 1635
 Lys Thr Val Leu Gly Lys Lys Glu Thr Leu Val Glu Asp Lys Leu
 1640 1645 1650
 Ser Leu Leu Asn Ser Asn Trp Ile Ala Val Thr Ser Arg Ala Glu
 1655 1660 1665
 Glu Trp Leu Asn Leu Leu Leu Glu Tyr Gln Lys His Met Glu Thr

ES 2 593 836 T3

| | | | | |
|-----------------------------|-----------------|-----------------|--|------|
| 1670 | | 1675 | | 1680 |
| Phe Asp Gln Asn Val Asp His | Ile Thr Lys Trp | Ile Ile Gln Ala | | |
| 1685 | | 1690 | | 1695 |
| Asp Thr Leu Leu Asp Glu Ser | Glu Lys Lys Lys | Pro Gln Gln Lys | | |
| 1700 | | 1705 | | 1710 |
| Glu Asp Val Leu Lys Arg Leu | Lys Ala Glu Leu | Asn Asp Ile Arg | | |
| 1715 | | 1720 | | 1725 |
| Pro Lys Val Asp Ser Thr Arg | Asp Gln Ala Ala | Asn Leu Met Ala | | |
| 1730 | | 1735 | | 1740 |
| Asn Arg Gly Asp His Cys Arg | Lys Leu Val Glu | Pro Gln Ile Ser | | |
| 1745 | | 1750 | | 1755 |
| Glu Leu Asn His Arg Phe Ala | Ala Ile Ser His | Arg Ile Lys Thr | | |
| 1760 | | 1765 | | 1770 |
| Gly Lys Ala Ser Ile Pro Leu | Lys Glu Leu Glu | Gln Phe Asn Ser | | |
| 1775 | | 1780 | | 1785 |
| Asp Ile Gln Lys Leu Leu Glu | Pro Leu Glu Ala | Glu Ile Gln Gln | | |
| 1790 | | 1795 | | 1800 |
| Gly Val Asn Leu Lys Glu Glu | Asp Phe Asn Lys | Asp Met Asn Glu | | |
| 1805 | | 1810 | | 1815 |
| Asp Asn Glu Gly Thr Val Lys | Glu Leu Leu Gln | Arg Gly Asp Asn | | |
| 1820 | | 1825 | | 1830 |
| Leu Gln Gln Arg Ile Thr Asp | Glu Arg Lys Arg | Glu Glu Ile Lys | | |
| 1835 | | 1840 | | 1845 |
| Ile Lys Gln Gln Leu Leu Gln | Thr Lys His Asn | Ala Leu Lys Asp | | |
| 1850 | | 1855 | | 1860 |
| Leu Arg Ser Gln Arg Arg Lys | Lys Ala Leu Glu | Ile Ser His Gln | | |
| 1865 | | 1870 | | 1875 |
| Trp Tyr Gln Tyr Lys Arg Gln | Ala Asp Asp Leu | Leu Lys Cys Leu | | |
| 1880 | | 1885 | | 1890 |
| Asp Asp Ile Glu Lys Lys Leu | Ala Ser Leu Pro | Glu Pro Arg Asp | | |
| 1895 | | 1900 | | 1905 |
| Glu Arg Lys Ile Lys Glu Ile | Asp Arg Glu Leu | Gln Lys Lys Lys | | |
| 1910 | | 1915 | | 1920 |

ES 2 593 836 T3

Glu Glu Leu Asn Ala Val Arg Arg Gln Ala Glu Gly Leu Ser Glu
 1925 1930 1935

Asp Gly Ala Ala Met Ala Val Glu Pro Thr Gln Ile Gln Leu Ser
 1940 1945 1950

Lys Arg Trp Arg Glu Ile Glu Ser Lys Phe Ala Gln Phe Arg Arg
 1955 1960 1965

Leu Asn Phe Ala Gln Ile His Thr Val Arg Glu Glu Thr Met Met
 1970 1975 1980

Val Met Thr Glu Asp Met Pro Leu Glu Ile Ser Tyr Val Pro Ser
 1985 1990 1995

Thr Tyr Leu Thr Glu Ile Thr His Val Ser Gln Ala Leu Leu Glu
 2000 2005 2010

Val Glu Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp Leu Cys Ala Lys Asp Phe
 2015 2020 2025

Glu Asp Leu Phe Lys Gln Glu Glu Ser Leu Lys Asn Ile Lys Asp
 2030 2035 2040

Ser Leu Gln Gln Ser Ser Gly Arg Ile Asp Ile Ile His Ser Lys
 2045 2050 2055

Lys Thr Ala Ala Leu Gln Ser Ala Thr Pro Val Glu Arg Val Lys
 2060 2065 2070

Leu Gln Glu Ala Leu Ser Gln Leu Asp Phe Gln Trp Glu Lys Val
 2075 2080 2085

Asn Lys Met Tyr Lys Asp Arg Gln Gly Arg Phe Asp Arg Ser Val
 2090 2095 2100

Glu Lys Trp Arg Arg Phe His Tyr Asp Ile Lys Ile Phe Asn Gln
 2105 2110 2115

Trp Leu Thr Glu Ala Glu Gln Phe Leu Arg Lys Thr Gln Ile Pro
 2120 2125 2130

Glu Asn Trp Glu His Ala Lys Tyr Lys Trp Tyr Leu Lys Glu Leu
 2135 2140 2145

Gln Asp Gly Ile Gly Gln Arg Gln Thr Val Val Arg Thr Leu Asn
 2150 2155 2160

ES 2 593 836 T3

Ala Thr Gly Glu Glu Ile Ile Gln Gln Ser Ser Lys Thr Asp Ala
 2165 2170 2175

Ser Ile Leu Gln Glu Lys Leu Gly Ser Leu Asn Leu Arg Trp Gln
 2180 2185 2190

Glu Val Cys Lys Gln Leu Ser Asp Arg Lys Lys Arg Leu Glu Glu
 2195 2200 2205

Gln Lys Asn Ile Leu Ser Glu Phe Gln Arg Asp Leu Asn Glu Phe
 2210 2215 2220

Val Leu Trp Leu Glu Glu Ala Asp Asn Ile Ala Ser Ile Pro Leu
 2225 2230 2235

Glu Pro Gly Lys Glu Gln Gln Leu Lys Glu Lys Leu Glu Gln Val
 2240 2245 2250

Lys Leu Leu Val Glu Glu Leu Pro Leu Arg Gln Gly Ile Leu Lys
 2255 2260 2265

Gln Leu Asn Glu Thr Gly Gly Pro Val Leu Val Ser Ala Pro Ile
 2270 2275 2280

Ser Pro Glu Glu Gln Asp Lys Leu Glu Asn Lys Leu Lys Gln Thr
 2285 2290 2295

Asn Leu Gln Trp Ile Lys Val Ser Arg Ala Leu Pro Glu Lys Gln
 2300 2305 2310

Gly Glu Ile Glu Ala Gln Ile Lys Asp Leu Gly Gln Leu Glu Lys
 2315 2320 2325

Lys Leu Glu Asp Leu Glu Glu Gln Leu Asn His Leu Leu Leu Trp
 2330 2335 2340

Leu Ser Pro Ile Arg Asn Gln Leu Glu Ile Tyr Asn Gln Pro Asn
 2345 2350 2355

Gln Glu Gly Pro Phe Asp Val Gln Glu Thr Glu Ile Ala Val Gln
 2360 2365 2370

Ala Lys Gln Pro Asp Val Glu Glu Ile Leu Ser Lys Gly Gln His
 2375 2380 2385

Leu Tyr Lys Glu Lys Pro Ala Thr Gln Pro Val Lys Arg Lys Leu
 2390 2395 2400

ES 2 593 836 T3

Glu Asp Leu Ser Ser Glu Trp Lys Ala Val Asn Arg Leu Leu Gln
 2405 2410 2415

Glu Leu Arg Ala Lys Gln Pro Asp Leu Ala Pro Gly Leu Thr Thr
 2420 2425 2430

Ile Gly Ala Ser Pro Thr Gln Thr Val Thr Leu Val Thr Gln Pro
 2435 2440 2445

Val Val Thr Lys Glu Thr Ala Ile Ser Lys Leu Glu Met Pro Ser
 2450 2455 2460

Ser Leu Met Leu Glu Val Pro Ala Leu Ala Asp Phe Asn Arg Ala
 2465 2470 2475

Trp Thr Glu Leu Thr Asp Trp Leu Ser Leu Leu Asp Gln Val Ile
 2480 2485 2490

Lys Ser Gln Arg Val Met Val Gly Asp Leu Glu Asp Ile Asn Glu
 2495 2500 2505

Met Ile Ile Lys Gln Lys Ala Thr Met Gln Asp Leu Glu Gln Arg
 2510 2515 2520

Arg Pro Gln Leu Glu Glu Leu Ile Thr Ala Ala Gln Asn Leu Lys
 2525 2530 2535

Asn Lys Thr Ser Asn Gln Glu Ala Arg Thr Ile Ile Thr Asp Arg
 2540 2545 2550

Ile Glu Arg Ile Gln Asn Gln Trp Asp Glu Val Gln Glu His Leu
 2555 2560 2565

Gln Asn Arg Arg Gln Gln Leu Asn Glu Met Leu Lys Asp Ser Thr
 2570 2575 2580

Gln Trp Leu Glu Ala Lys Glu Glu Ala Glu Gln Val Leu Gly Gln
 2585 2590 2595

Ala Arg Ala Lys Leu Glu Ser Trp Lys Glu Gly Pro Tyr Thr Val
 2600 2605 2610

Asp Ala Ile Gln Lys Lys Ile Thr Glu Thr Lys Gln Leu Ala Lys
 2615 2620 2625

Asp Leu Arg Gln Trp Gln Thr Asn Val Asp Val Ala Asn Asp Leu
 2630 2635 2640

Ala Leu Lys Leu Leu Arg Asp Tyr Ser Ala Asp Asp Thr Arg Lys

ES 2 593 836 T3

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|
| 2645 | | | | | | 2650 | | | | | | | | 2655 |
| Val | His | Met | Ile | Thr | Glu | Asn | Ile | Asn | Ala | Ser | Trp | Arg | Ser | Ile |
| 2660 | | | | | | 2665 | | | | | 2670 | | | |
| His | Lys | Arg | Val | Ser | Glu | Arg | Glu | Ala | Ala | Leu | Glu | Glu | Thr | His |
| 2675 | | | | | | 2680 | | | | | 2685 | | | |
| Arg | Leu | Leu | Gln | Gln | Phe | Pro | Leu | Asp | Leu | Glu | Lys | Phe | Leu | Ala |
| 2690 | | | | | | 2695 | | | | | 2700 | | | |
| Trp | Leu | Thr | Glu | Ala | Glu | Thr | Thr | Ala | Asn | Val | Leu | Gln | Asp | Ala |
| 2705 | | | | | | 2710 | | | | | 2715 | | | |
| Thr | Arg | Lys | Glu | Arg | Leu | Leu | Glu | Asp | Ser | Lys | Gly | Val | Lys | Glu |
| 2720 | | | | | | 2725 | | | | | 2730 | | | |
| Leu | Met | Lys | Gln | Trp | Gln | Asp | Leu | Gln | Gly | Glu | Ile | Glu | Ala | His |
| 2735 | | | | | | 2740 | | | | | 2745 | | | |
| Thr | Asp | Val | Tyr | His | Asn | Leu | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | Lys | Ile | Leu |
| 2750 | | | | | | 2755 | | | | | 2760 | | | |
| Arg | Ser | Leu | Glu | Gly | Ser | Asp | Asp | Ala | Val | Leu | Leu | Gln | Arg | Arg |
| 2765 | | | | | | 2770 | | | | | 2775 | | | |
| Leu | Asp | Asn | Met | Asn | Phe | Lys | Trp | Ser | Glu | Leu | Arg | Lys | Lys | Ser |
| 2780 | | | | | | 2785 | | | | | 2790 | | | |
| Leu | Asn | Ile | Arg | Ser | His | Leu | Glu | Ala | Ser | Ser | Asp | Gln | Trp | Lys |
| 2795 | | | | | | 2800 | | | | | 2805 | | | |
| Arg | Leu | His | Leu | Ser | Leu | Gln | Glu | Leu | Leu | Val | Trp | Leu | Gln | Leu |
| 2810 | | | | | | 2815 | | | | | 2820 | | | |
| Lys | Asp | Asp | Glu | Leu | Ser | Arg | Gln | Ala | Pro | Ile | Gly | Gly | Asp | Phe |
| 2825 | | | | | | 2830 | | | | | 2835 | | | |
| Pro | Ala | Val | Gln | Lys | Gln | Asn | Asp | Val | His | Arg | Ala | Phe | Lys | Arg |
| 2840 | | | | | | 2845 | | | | | 2850 | | | |
| Glu | Leu | Lys | Thr | Lys | Glu | Pro | Val | Ile | Met | Ser | Thr | Leu | Glu | Thr |
| 2855 | | | | | | 2860 | | | | | 2865 | | | |
| Val | Arg | Ile | Phe | Leu | Thr | Glu | Gln | Pro | Leu | Glu | Gly | Leu | Glu | Lys |
| 2870 | | | | | | 2875 | | | | | 2880 | | | |
| Leu | Tyr | Gln | Glu | Pro | Arg | Glu | Leu | Pro | Pro | Glu | Glu | Arg | Ala | Gln |
| 2885 | | | | | | 2890 | | | | | 2895 | | | |

ES 2 593 836 T3

Asn Val Thr Arg Leu Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Val Asn Thr
 2900 2905 2910

Glu Trp Glu Lys Leu Asn Leu His Ser Ala Asp Trp Gln Arg Lys
 2915 2920 2925

Ile Asp Glu Thr Leu Glu Arg Leu Gln Glu Leu Gln Glu Ala Thr
 2930 2935 2940

Asp Glu Leu Asp Leu Lys Leu Arg Gln Ala Glu Val Ile Lys Gly
 2945 2950 2955

Ser Trp Gln Pro Val Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ser Leu Gln Asp
 2960 2965 2970

His Leu Glu Lys Val Lys Ala Leu Arg Gly Glu Ile Ala Pro Leu
 2975 2980 2985

Lys Glu Asn Val Ser His Val Asn Asp Leu Ala Arg Gln Leu Thr
 2990 2995 3000

Thr Leu Gly Ile Gln Leu Ser Pro Tyr Asn Leu Ser Thr Leu Glu
 3005 3010 3015

Asp Leu Asn Thr Arg Trp Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp
 3020 3025 3030

Arg Val Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala
 3035 3040 3045

Ser Gln His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg
 3050 3055 3060

Ala Ile Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr
 3065 3070 3075

Gln Thr Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln
 3080 3085 3090

Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr
 3095 3100 3105

Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu
 3110 3115 3120

Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu
 3125 3130 3135

ES 2 593 836 T3

Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys
 3140 3145 3150

Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu
 3155 3160 3165

Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu
 3170 3175 3180

Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser
 3185 3190 3195

Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp
 3200 3205 3210

Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe
 3215 3220 3225

Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln
 3230 3235 3240

Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn
 3245 3250 3255

Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys
 3260 3265 3270

Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu
 3275 3280 3285

Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala
 3290 3295 3300

Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu
 3305 3310 3315

Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn
 3320 3325 3330

Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys
 3335 3340 3345

Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr
 3350 3355 3360

Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn
 3365 3370 3375

ES 2 593 836 T3

Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly
 3380 3385 3390
 Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr
 3395 3400 3405
 Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala
 3410 3415 3420
 Ser Ser Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu
 3425 3430 3435
 His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser
 3440 3445 3450
 Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu
 3455 3460 3465
 His Leu Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser
 3470 3475 3480
 Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu
 3485 3490 3495
 Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu
 3500 3505 3510
 Glu Glu Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys
 3515 3520 3525
 Gln Gln His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro
 3530 3535 3540
 Glu Met Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu
 3545 3550 3555
 Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu
 3560 3565 3570
 Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser
 3575 3580 3585
 Gln Leu His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu
 3590 3595 3600
 Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu
 3605 3610 3615
 Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly

ES 2 593 836 T3

3620

3625

3630

Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro
3635 3640 3645

Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu
3650 3655 3660

Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys
3665 3670 3675

Pro Met Arg Glu Asp Thr Met
3680 3685

<210> 2
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

5

<220>
<223> oligonucleótido

10 <400> 2
guaccuccaa caucaaggaa gaugg 25

<210> 3
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

15

<220>
<223> oligonucleótido

20 <400> 3
uaccuccaac aucaaggaag auggc 25

<210> 4
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

25

<220>
<223> oligonucleótido

30 <400> 4
accuccaaca ucaaggaaga uggca 25

<210> 5
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

35

<220>
<223> oligonucleótido

40

<400> 5
ccuccaacau caaggaagau ggcau 25

45

<210> 6
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 6
 5 cuccaacauc aaggaagaug gcauu 25

 <210> 7
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 7
 15 uccaacauca aggaagaugg cauuu 25

 <210> 8
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 8
 ccaacaucaa ggaagauggc auuuc 25

 <210> 9
 30 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 9
 caacaucaag gaagauggca uuucu 25

 <210> 10
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> oligonucleótido

 <400> 10
 50 aacaucaagg aagauggcau uuucua 25

 <210> 11
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 11
 60 acaucaagga agauggcauu ucuag 25

 <210> 12
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 12
 5 caucaaggaa gauggcauuu cuagu 25

 <210> 13
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 13
 15 aucaaggaag auggcauuuc uaguu 25

 <210> 14
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 14
 25 ucaaggaaga uggcauuucu aguuu 25

 <210> 15
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 15
 35 caaggaagau ggcauuucua guuug 25

 <210> 16
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 16
 50 aaggaagau gcauuucuag uuugg 25

 <210> 17
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 17
 60 aggaagaugg cauuucuagu uugga 25

 <210> 18
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 18
 5 ggaagauggc auuucuaguu uggag 25

 <210> 19
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 19
 15 gaagauggca uuucuaguuu ggaga 25

 <210> 20
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 20
 aagauggcau uucuaguuug gagau 25

 <210> 21
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 21
 agauggcauu ucuaguuugg agaug 25

 <210> 22
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 45
 <400> 22
 50 gauggcauuu cuaguuugga gaugg 25

 <210> 23
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 23
 60 auggcauuuc uaguuuggag auggc 25

 <210> 24
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 24
 5 uggcauuucu aguuuggaga uggca 25

 <210> 25
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 25
 15 ggcauuucua guuuggagau ggcag 25

 <210> 26
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 26
 gcuuuucua uuuggagaug gcagu 25

 <210> 27
 30 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 27
 cauuucuagu uuggagaugg cagu 25

 <210> 28
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> oligonucleótido

 <400> 28
 50 auuucuaguu uggagauggc aguuu 25

 <210> 29
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 29
 60 uuucuaguuu ggagauggca guuuc 25

 <210> 30
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 30
 5 uucuaguuug gagauggcag uuucc 25

 <210> 31
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 31
 15 ucuaguuugg agauggcagu uuccu 25

 <210> 32
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 32
 cuaguuugga gauggcaguu uccuu 25

 <210> 33
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 33
 uaguuuggag auggcaguuu ccuaa 25

 <210> 34
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 45
 <400> 34
 50 aguuuggaga uggcaguuuc cuuag 25

 <210> 35
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 35
 60 guuuggagau ggcaguuucc uuagu 25

 <210> 36
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 36
 5 uuuggagaug gcaguuuccu uagua 25

 <210> 37
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 37
 15 uuggagaugg caguuuccu uagua 25

 <210> 38
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 38
 uggagauggc aguuuccua guaac 25

 <210> 39
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 39
 gagauggcag uuuccuagu aacca 25

 <210> 40
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40

 <220>
 <223> oligonucleótido
 45

 <400> 40
 50 agauggcagu uuuccuagua accac 25

 <210> 41
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 41
 60 gauggcaguu uccuaguaa ccaca 25

 <210> 42
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 42
 5 auggcaguuu ccuaguaac cacag 25

 <210> 43
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 43
 15 uggcaguuuc cuuaguaacc acagg 25

 <210> 44
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 44
 ggcaguuucc uuaguaacca 25

 <210> 45
 <211> 25
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 45
 gcaguuuccu uaguaaccac agguu 25

 <210> 46
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40

 <220>
 <223> oligonucleótido
 45
 <400> 46
 50 caguuuccuu aguaaccaca gguug 25

 <210> 47
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 47
 60 aguuuccuua guaaccacag guugu 25

 <210> 48
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 48
 5 guuuccuag uaaccacagg uugug 25

 <210> 49
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 49
 15 uuuccuagu aaccacaggu ugugu 25

 <210> 50
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 50
 uuccuagua accacaggu guguc 25

 <210> 51
 30 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 51
 uccuaguaa ccacagguug uguca 25

 <210> 52
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> oligonucleótido

 <400> 52
 50 ccuaguaac cacagguugu gucac 25

 <210> 53
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 53
 60 cuuaguaacc acagguugug ucacc 25

 <210> 54
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 54
 5 uuaguaacca cagguugugu cacca 25

 <210> 55
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 55
 15 uaguaaccac agguuguguc accag 25

 <210> 56
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 56
 aguaaccaca gguuguguca ccaga 25

 <210> 57
 <211> 25
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 57
 guaaccacag guugugucac cagag 25

 <210> 58
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40

 <220>
 <223> oligonucleótido
 45

 <400> 58
 50 uaaccacagg uugugucacc agagu 25

 <210> 59
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 59
 60 aaccacaggu ugugucacca gagua 25

 <210> 60
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 60
 5 accacagguu gugucaccag aguaa 25

 <210> 61
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 61
 15 ccacagguug ugucaccaga guaac 25

 <210> 62
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 62
 25 cacagguugu gucaccagag uaaca 25

 <210> 63
 <211> 25
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 63
 35 acagguugug ucaccagagu aacag 25

 <210> 64
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 64
 50 cagguugugu caccagagua acagu 25

 <210> 65
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 65
 60 agguuguguc accagaguaa caguc 25

 <210> 66
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 66
 5 gguuguguca ccagaguaac agucu 25

 <210> 67
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 67
 15 guugugucac cagaguaaca gucug 25

 <210> 68
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 68
 uugugucacc agaguaacag ucuga 25

 <210> 69
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 69
 ugugucacca gaguaacagu cugag 25

 <210> 70
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40

 <220>
 <223> oligonucleótido
 45

 <400> 70
 50 gugucaccag aguaacaguc ugagu 25

 <210> 71
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 71
 60 ugucaccaga guaacagucu gagua 25

 <210> 72
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 72
 5 gucaccagag uaacagucug aguag 25

 <210> 73
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 73
 15 ucaccagagu aacagucuga guagg 25

 <210> 74
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 74
 caccagagua acagucugag uagga 25

 <210> 75
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 75
 accagaguaa cagucugagu aggag 25

 <210> 76
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 45
 <400> 76
 50 uuugccgcug cccaugcca uccug 25

 <210> 77
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 77
 60 auucaauguu cugacaacag uuugc 25

 <210> 78
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 78
 5 ccaguugcau ucaauguucu gacaa 25

 <210> 79
 <211> 22
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 15 <400> 79
 caguugcauu caauguucug ac 22

 <210> 80
 <211> 20
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 25 <400> 80
 aguugcauuc aauguucuga 20

 <210> 81
 <211> 21
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 35 <400> 81
 gauugcugaa uuauuucuuc c 21

 40 <210> 82
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 82
 50 gauugcugaa uuauuucuuc cccag 25

 <210> 83
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 83
 60 auugcugaau uauuucuucc ccagu 25

 <210> 84
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 84
 5 uugcugaauu auuucuuccc caguu 25

 <210> 85
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 85
 15 ugcugaauua uuucuuccc aguug 25

 <210> 86
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 86
 25 gcugaauuau uucuuccca guugc 25

 <210> 87
 <211> 25
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 87
 35 cugaauuuu ucuucccag uugca 25

 <210> 88
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 88
 50 ugaauuuuu cuucccagu ugcau 25

 <210> 89
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 89
 60 gaauuuuuu uucccaguu gcauu 25

 <210> 90
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 90
 5 aauuuuuucu uccccaguug cauuc 25

 <210> 91
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 91
 15 auuuuuucuu ccccaguugc auuca 25

 <210> 92
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 92
 uuauuuucuc cccaguugca uucaa 25

 <210> 93
 <211> 25
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 93
 uauuuucucc ccaguugcau ucaau 25

 <210> 94
 <211> 25
 <212> ARN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 45
 <400> 94
 50 auuucuuccc caguugcauu caaug 25

 <210> 95
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 95
 60 uuucuucccc aguugcauuc aaugu 25

 <210> 96
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 96
 5 uucuucccca guugcaucau auguu 25

 <210> 97
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 97
 15 ucuuccccag uugcaucau uguuc 25

 <210> 98
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 98
 cuuccccagu ugcaucaau guucu 25

 <210> 99
 30 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 99
 uuccccaguu gcaucaaug uucug 25

 <210> 100
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> oligonucleótido

 <400> 100
 50 uccccaguug caucaaugu ucuga 25

 <210> 101
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 101
 60 ccccaguugc auucaaugu cugac 25

 <210> 102
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

5 <400> 102
 cccaguugca uucaauguuc ugaca 25

10 <210> 103
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> oligonucleótido

15 <400> 103
 ccaguugcau ucaauguucu gacaa 25

20 <210> 104
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> oligonucleótido

25 <400> 104
 caguugcauu caauguucug acaac 25

30 <210> 105
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> oligonucleótido

35 <400> 105
 aguugcauuc aauguucuga caaca 25

40 <210> 106
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido

50 <400> 106
 uccuguagaa uacuggcauc 20

55 <210> 107
 <211> 27
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> oligonucleótido

60 <400> 107
 ugcagaccuc cugccaccgc agauuca 27

65 <210> 108
 <211> 34
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 108
 5 uugcagaccu ccugccaccg cagauucagg cuuc 34

<210> 109
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 109
 15 guugcauuca auguucugac aacag 25

<210> 110
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 110
 25 uugcauucua uguucugaca acagu 25

<210> 111
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 111
 35 ugcauucuu guucugaca caguu 25

<210> 112
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 112
 50 gcäuucäuug uucugacaac aguuu 25

<210> 113
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 113
 60 cauucäuug ucugacaaca guuug 25

<210> 114
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 114
 5 auucaauguu cugacaacag uuugc 25

 <210> 115
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 115
 15 ucaauguucu gacaacaguu ugccg 25

 <210> 116
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 116
 caauguucug acaacaguuu gccgc 25

 <210> 117
 30 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 117
 aauguucuga caacaguuug ccgcu 25

 <210> 118
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> oligonucleótido

 <400> 118
 50 auguucugac aacaguuugc cgugc 25

 <210> 119
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 119
 60 uguucugaca acaguuugcc gcugc 25

 <210> 120
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 120
 5 guucugacaa caguugccg cugcc 25

 <210> 121
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 121
 15 uucugacaac aguuugccgc ugccc 25

 <210> 122
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 122
 25 ucugacaaca guuugccgcu gccca 25

 <210> 123
 <211> 25
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 123
 35 cugacaacag uuugccgcug cccaa 25

 <210> 124
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 124
 50 ugacaacagu uugccgcugc ccaau 25
 <210> 125
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 125
 60 gacaacaguu ugccgcugcc caaug 25

 <210> 126
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 126
 5 acaacaguuu gccgcugccc aaugc 25

 <210> 127
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 127
 15 caacaguuug ccgcugccca augcc 25

 <210> 128
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 128
 aacaguuugc cgcugcccaa 25

 <210> 129
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 129
 acaguuugcc gcugcccaau gccau 25

 <210> 130
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 45 <400> 130
 caguuugccg cugcccaaug ccauc 25

 <210> 131
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50

 <220>
 <223> oligonucleótido
 55

 <400> 131
 60 aguuugccgc ugcccaaug caucc 25

 <210> 132
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65

 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 132
 guuugccgcu gcccaaugcc auccu 25
 5
 <210> 133
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 133
 15 uuugccgcug cccaugcca uccug 25
 <210> 134
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 134
 uugccgcugc ccaaugccau ccugg 25
 <210> 135
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 135
 ugccgcugcc caaugccauc cugga 25
 <210> 136
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 136
 gccgcugccc aaugccauc uggag 25
 50 <210> 137
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 137
 60 ccgcugccca augccaucc ggagu 25
 <210> 138
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 138
 cgugcccaa ugccaucug gaguu 25
 5
 <210> 139
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 139
 15 uuuuuugag gauugcugaa 20
 <210> 140
 <211> 40
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 140
 uguucugaca acaguuugcc gcugcccaau gccaucugg 40
 <210> 141
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 141
 cucuggccug uccuaagacc ugcuc 25
 <210> 142
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 142
 ucuggccugu ccuaagaccu gcuca 25
 50 <210> 143
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 143
 60 cuggccuguc cuaagaccug cucag 25
 <210> 144
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 144
 5 uggccugucc uaagaccugc ucagc 25
 <210> 145
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 145
 15 ggccuguccu aagaccugcu cagcu 25
 <210> 146
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 146
 gccuguccua agaccugcuc agcuu 25
 <210> 147
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 147
 ccuguccuaa gaccugcuca gcuuc 25
 <210> 148
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 148
 cuguccuaag accugcucag cuucu 25
 50 <210> 149
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 149
 60 uguccuaaga ccugcucagc uucuu 25
 <210> 150
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 150
 guccuaagac cugcucagcu ucuuc 25
 5
 <210> 151
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 151
 15 uccuaagacc ugcucagcu cuucc 25
 <210> 152
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 152
 ccuaagaccu gcucagcuuc uuccu 25
 <210> 153
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 153
 cuaagaccug cucagcuucu uccuu 25
 <210> 154
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 154
 uaagaccugc ucagcuucu ccuaa 25
 50 <210> 155
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 155
 60 aagaccugcu cagcuucuuc cuuag 25
 <210> 156
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 156
 agaccugcuc agcuucuucc uuagc 25
 5
 <210> 157
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 157
 15 gaccugcuca gcuucuuccu uagcu 25
 <210> 158
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 158
 accugcucag cuucuuccu agcuu 25
 <210> 159
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 159
 ccugcucagc uucuuccuua gcuuc 25
 <210> 160
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 160
 cugcucagcu ucuuccuag cuucc 25
 50 <210> 161
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 161
 60 ugcucagcuu cuuccuagc uucca 25
 <210> 162
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 162
 gcucagcuuc uccuuagcu uccag 25
 5
 <210> 163
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 163
 15 cucagcuucu uccuuagcuu ccagc 25
 <210> 164
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 164
 ucagcuucu cccuagcuuc cagcc 25
 <210> 165
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 165
 cagcuucuuc cuuagcuucc agcca 25
 <210> 166
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 166
 agcuucuucc uuagcuucca gccau 25
 50 <210> 167
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 167
 60 gcuucuuccu uagcuuccag ccauu 25
 <210> 168
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 168
 cuucuuccuu agcuuccagc caug 25

5

<210> 169
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 169
 uucuuccuua gcuuccagcc auugu 25

15

<210> 170
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 170
 ucuuccuag cuuccagcca uugug 25

25

<210> 171
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 171
 cuuccuuagc uuccagccau ugugu 25

35

<210> 172
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 172
 uuccuuagcu uccagccau guguu 25

45

<210> 173
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 173
 uccuuagcuu ccagccauug uguug 25

55

<210> 174
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>

65

<223> oligonucleótido
 <400> 174
 5 ccuagcuuc cagccauugu guuga 25
 <210> 175
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 175
 15 cuuagcuucc agccauugug uugaa 25
 <210> 176
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 176
 uuagcuucca gccauugugu ugaau 25
 <210> 177
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 177
 uagcuuccag ccauuguguu gaauc 25
 <210> 178
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 178
 agcuuccagc cauuguguug aauc 25
 50 <210> 179
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 179
 60 gcuuccagcc auuguguuga auccu 25
 <210> 180
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 180
 5 cuuccagcca uuguguugaa uccuu 25
 <210> 181
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 181
 15 uuccagccau uguguugaau ccuuu 25
 <210> 182
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 182
 uccagccauu guguugaaucc cuuua 25
 <210> 183
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 183
 ccagccauug uguugaaucc uuuaa 25
 <210> 184
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 184
 cagccauugu guugaauccu uuaac 25
 50 <210> 185
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 185
 60 agccauugug uugaauccuu uaaca 25
 <210> 186
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 186
 gccauugugu ugaauccuuu acau 25
 5
 <210> 187
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 187
 15 ccuuguguu gaaucuuua acau 25
 <210> 188
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 188
 cauuguguug aaucuuuaa cauu 25
 <210> 189
 <211> 20
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 189
 ucagcuucug uuagccacug 20
 <210> 190
 40 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 190
 uucagcuucu guuagccacu 20
 50 <210> 191
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 191
 60 uucagcuucu guuagccacu g 21
 <210> 192
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 192
 ucagcuucug uuagccacug a 21
 5
 <210> 193
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 193
 15 uucagcuucu guuagccacu ga 22
 <210> 194
 <211> 21
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 194
 ucagcuucug uuagccacug a 21
 <210> 195
 <211> 22
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 195
 uucagcuucu guuagccacu ga 22
 <210> 196
 40 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 196
 ucagcuucug uuagccacug au 22
 50 <210> 197
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 197
 60 uucagcuucu guuagccacu gau 23
 <210> 198
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 198
 ucagcuucug uuagccacug auu 23
 5
 <210> 199
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 199
 15 uucagcuucu guuagccacu gauu 24
 <210> 200
 <211> 24
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 200
 ucagcuucug uuagccacug auua 24
 <210> 201
 <211> 24
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 201
 uucagcuucu guuagccacu gaua 24
 <210> 202
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 202
 ucagcuucug uuagccacug auuaa 25
 50 <210> 203
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 203
 60 uucagcuucu guuagccacu gauuaa 26
 <210> 204
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 204
 ucagcuucug uuagccacug auuaaa 26
 5
 <210> 205
 <211> 27
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 205
 15 uucagcuucu guuagccacu gauuaaa 27
 <210> 206
 <211> 19
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 206
 cagcuucugu uagccacug 19
 <210> 207
 <211> 21
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 207
 cagcuucugu uagccacuga u 21
 <210> 208
 40 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 208
 agcuucuguu agccacugau u 21
 50 <210> 209
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 209
 60 cagcuucugu uagccacuga uu 22
 <210> 210
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 210
 agcuucuguu agccacugau ua 22
 5
 <210> 211
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 211
 15 cagcuucugu uagccacuga uua 23
 <210> 212
 <211> 23
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 212
 agcuucuguu agccacugau uaa 23
 <210> 213
 <211> 24
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 213
 cagcuucugu uagccacuga uaaa 24
 <210> 214
 40 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 214
 agcuucuguu agccacugau uaaa 24
 50 <210> 215
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 215
 60 cagcuucugu uagccacuga uaaaa 25
 <210> 216
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 216
 agcuucuguu agccacugau uaaa 24
 5
 <210> 217
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 217
 15 agcuucuguu agccacugau 20
 <210> 218
 <211> 20
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 218
 gcuucuguu gccacugau 20
 <210> 219
 <211> 21
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 219
 agcuucuguu agccacugau u 21
 <210> 220
 40 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 220
 gcuucuguu gccacugau a 21
 50 <210> 221
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 221
 agcuucuguu agccacugau ua 22
 60 <210> 222
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 222
 gcuucuguaa gccacugau aa 22
 5
 <210> 223
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 223
 15 agcuucuguu agccacugau uaa 23
 <210> 224
 <211> 23
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 224
 gcuucuguaa gccacugau aaa 23
 <210> 225
 <211> 24
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 225
 agcuucuguu agccacugau uaaa 24
 <210> 226
 40 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 226
 gcuucuguaa gccacugau aaa 23
 50 <210> 227
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 227
 60 ccauuuguau uuagcauguu ccc 23
 <210> 228
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 228
 5 agauaccuu uguauuuagc 20
 <210> 229
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 229
 15 gccauuucuc aacagaucu 19
 <210> 230
 <211> 23
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 230
 gccauuucuc aacagaucug uca 23
 <210> 231
 <211> 23
 <212> ARN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 231
 auucucagga auuugugucu uuc 23
 <210> 232
 <211> 21
 <212> ARN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 45 <400> 232
 ucucaggaau uuugucuuu c 21
 <210> 233
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 233
 60 guucagcuuc uguuagcc 18
 <210> 234
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 234
 cugauuaaaau aucuuuauau c 21
 5
 <210> 235
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 235
 15 gccgccauuu cucaacag 18
 <210> 236
 <211> 18
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 236
 guauuuagca uguucca 18
 <210> 237
 <211> 18
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 237
 caggaauuug ugucuuuc 18
 <210> 238
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 238
 gcuuuucuuu uaguugcugc ucuuu 25
 50 <210> 239
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 239
 60 cuuuucuuuu aguugcugcu cuuuu 25
 <210> 240
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 240
 uuuucuuua guugcugcuc uuuc 25
 5
 <210> 241
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 241
 15 uuucuuuag uugcugcucu uuuc 25
 <210> 242
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 242
 uuuuuuagu ugcugcucu uuca 25
 <210> 243
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 243
 uuuuuagu gcugcucuu uccag 25
 <210> 244
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 244
 cuuuuaguug cugcucuuu ccagg 25
 50 <210> 245
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 245
 60 uuuuaguugc ugcucuuuc caggu 25
 <210> 246
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 246
 uuuaguugcu gcucuuuucc agguu 25
 5
 <210> 247
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 247
 15 uuaguugcug cucuuuucca gguuc 25
 <210> 248
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 248
 uaguugcugc ucuuuuccag guuca 25
 <210> 249
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 249
 aguugcugcu cuuuuccagg uucaa 25
 <210> 250
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 250
 guugcugcuc uuuuccaggu ucaag 25
 50 <210> 251
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 251
 uugcugcucu uuuccaggu caagu 25
 60 <210> 252
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 252
 ugcugcucuu uuccagguuc aagug 25
 5
 <210> 253
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 253
 15 gcugcucuuu uccagguuca agugg 25
 <210> 254
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 254
 cugcucuuuu ccagguuca gugg 25
 <210> 255
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 255
 ugcucuuuuc cagguucaag ugga 25
 <210> 256
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 256
 gcucuuuucc agguucaagu gggac 25
 50 <210> 257
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 257
 60 cucuuuucca gguucaagug ggaua 25
 <210> 258
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 258
 uuuuuuccag guucaagugg gauac 25
 5
 <210> 259
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 259
 15 uuuuuuccag guucaagugg 20
 <210> 260
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 260
 cuuuuccagg uucaaguggg auacu 25
 <210> 261
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 261
 uuuuccaggu ucaaguggga uacua 25
 <210> 262
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 262
 uuuccagguu caagugggau acuag 25
 50 <210> 263
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 263
 uuccagguuc aagugggaua cuagc 25
 60 <210> 264
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 264
 uccagguuca agugggauac uagca 25
 5
 <210> 265
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 265
 15 ccagguuca gugggauacu agcaa 25
 <210> 266
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 266
 cagguucaag ugggauacua gcaau 25
 <210> 267
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 267
 agguucaagu gggauacuag caaug 25
 <210> 268
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 268
 gguucaagug ggauacuagc aaugu 25
 50 <210> 269
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 269
 60 guucaagugg gauacuagca auguu 25
 <210> 270
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 270
 uucaaguggg auacuagcaa uguua 25
 5
 <210> 271
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 271
 15 ucaaguggga uacuagcaau guuau 25
 <210> 272
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 272
 caagugggau acuagcaaug uuauc 25
 <210> 273
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 273
 aagugggaur cuagcaaugu uaucu 25
 <210> 274
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 274
 agugggaur uagcaaugu aucug 25
 50 <210> 275
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 275
 60 gugggauru agcaauguua ucugc 25
 <210> 276
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 276
 ugggauacua gcaauguuau cugcu 25

5

<210> 277
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> oligonucleótido

<400> 277
 15 gggauacuag caauguuau ucguu 25

<210> 278
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

25 <400> 278
 ggauacuagc aauguuau cuuc 25

<210> 279
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

35 <400> 279
 gauacuagca auguuau cuuc 25

<210> 280
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 45 <223> oligonucleótido

<400> 280
 auacuagcaa uguuau cuuc 25

50 <210> 281
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> oligonucleótido

<400> 281
 60 uacuagcau guuau cuuc 25

<210> 282
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 282
 acuagcaaug uauaucugcuu ccucc 25
 5
 <210> 283
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 283
 15 cuagcaaugu uaucugcuuc cucca 25
 <210> 284
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 284
 uagcaauguu aucugcuucc uccaa 25
 <210> 285
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 285
 agcaauguua ucugcuuccu ccaac 25
 <210> 286
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 286
 gcaauguuau cugcuuccuc caacc 25
 50 <210> 287
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 287
 60 caauguuauc ugcuccucc aacca 25
 <210> 288
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 288
 5 aauguuau cuuccucca accau 25
 <210> 289
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 289
 15 auguuaucug cuuccucca ccaua 25
 <210> 290
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 290
 uguuaucugc uuccuccaac cauaa 25
 <210> 291
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 291
 agccucuuga ugcuggucu uguuu 25
 <210> 292
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 292
 gccucuugau ugcuggucuu guuuu 25
 50 <210> 293
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 293
 60 ccucuugau gcuggucuug uuuuu 25
 <210> 294
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 294
 ccucuugauu gcuggucuug 20
 5
 <210> 295
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 295
 15 cucuugauug cuggucuugu uuuuc 25
 <210> 296
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 296
 ucuugauugc uggucuuguu uuuca 25
 <210> 297
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 297
 cuugauugcu ggucuuguuu uucaa 25
 <210> 298
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 298
 uugauugcug gucuuguuuu ucaaa 25
 50 <210> 299
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 299
 60 ugauugcugg ucuuguuuuu caaa 25
 <210> 300
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 300
 gauugcuggu cuuguuuuuc aaau 25
 5
 <210> 301
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 301
 15 gauugcuggu cuuguuuuuc 20
 <210> 302
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 302
 auugcugguc uuguuuuuc aaau 25
 <210> 303
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 303
 uugcuggucu uguuuuuc aaau 25
 <210> 304
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 304
 ugcuggucu guuuuuc aaau 25
 50 <210> 305
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 305
 gcuggucuugu uuuuuc aaau 25
 60 <210> 306
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 306
 cuggucuugu uuuucaaauu uuggg 25
 5
 <210> 307
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 307
 15 uggucuuguu uuucaaaauu ugggc 25
 <210> 308
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 308
 ggucuuguuu uucaaaauuu gggca 25
 <210> 309
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 309
 gucuuguuuu ucaaaauuug ggcag 25
 <210> 310
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 310
 ucuuguuuuu caaaauuugg gcagc 25
 50 <210> 311
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 311
 60 cuuguuuuuc aaauuuuggg cagcg 25
 <210> 312
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 312
 5 uuuuuuuca aauuuugggc agcgg 25
 <210> 313
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 313
 15 uuuuuuucaa auuuugggca gcggu 25
 <210> 314
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 314
 guuuuucaaa uuugggcag cggu 25
 <210> 315
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 315
 uuuuucaaa uuugggcagc gguaa 25
 <210> 316
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 316
 uuuucaaau uuugggcagc gaa 25
 50 <210> 317
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 317
 60 uuucaaaau uuugggcagcg uaaug 25
 <210> 318
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 318
 uucaaaauuuu gggcagcggg aauga 25
 5
 <210> 319
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 319
 15 ucaaaauuuug ggcagcggua augag 25
 <210> 320
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 320
 caaaauuuugg gcagcgguaa ugagu 25
 <210> 321
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 321
 aaaaauuuuggg cagcgguaau gaguu 25
 <210> 322
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 322
 aaaaauuuuggc agcgguaaug aguuc 25
 50 <210> 323
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 323
 60 aaaaauuuuggca gcgguaauga guucu 25
 <210> 324
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 324
 uuuugggcag cgguaaugag uucuu 25
 5
 <210> 325
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 325
 15 uuugggcagc gguaaugagu ucuuc 25
 <210> 326
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 326
 uugggcagcg guaaugaguu cuucc 25
 <210> 327
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 327
 ugggcagcgg uaaugaguuc uucca 25
 <210> 328
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 328
 ggcagcggg aaugaguucu uccaa 25
 50 <210> 329
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 329
 60 ggcagcggua augaguucuu ccaac 25
 <210> 330
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 330
 gcagcgguaa ugaguucuuc caacu 25
 5
 <210> 331
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 331
 15 cagcgguaau gaguucuucc aacug 25
 <210> 332
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 332
 agcgguaaug aguucuucca acugg 25
 <210> 333
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 333
 gcgguaauga guucuuccaa cuggg 25
 <210> 334
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 334
 cgguaaugag uucuuccaac ugggg 25
 50 <210> 335
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 335
 60 gguaaugagu ucuuccaacu gggga 25
 <210> 336
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 336
 5 gguaaugagu ucuuccaacu gg 22
 <210> 337
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 337
 15 guaaugaguu cuuccaacug gggac 25
 <210> 338
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 338
 uaaugaguuc uuccaacugg ggacg 25
 <210> 339
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 339
 aaugaguucu uccaacuggg gacgc 25
 <210> 340
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 340
 augaguucuu ccaacugggg acgcc 25
 50 <210> 341
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 341
 60 ugaguucuuc caacugggga cgccu 25
 <210> 342
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 342
 5 gaguucuucc aacuggggac gccuc 25
 <210> 343
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 343
 15 aguucuucca acuggggacg ccucu 25
 <210> 344
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 344
 guucuuccaa cuggggacgc cucug 25
 <210> 345
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 345
 uucuuccaac uggggacgcc ucugu 25
 <210> 346
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 346
 ucuuccaacu ggggacgccu cuguu 25
 50 <210> 347
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 347
 60 cuuccaacug gggacgccuc uguuc 25
 <210> 348
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 348
 uuccaacugg ggagccucu guucc 25
 5
 <210> 349
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 349
 15 uccaacuggg gacgccucug uucca 25
 <210> 350
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 350
 ccaacugggg acgccucugu ucca 25
 <210> 351
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 351
 caacugggga cgccucuguu ccaa 25
 <210> 352
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 352
 aacuggggac gccucuguuc caaa 25
 50 <210> 353
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 353
 60 acuggggacg ccucuguucc aaau 25
 <210> 354
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 354
 5 cuggggacgc cucuguucca aaucc 25
 <210> 355
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 355
 15 uggggacgcc ucuguucca auccu 25
 <210> 356
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 356
 ggggacgccu cuguuccaaa uccug 25
 <210> 357
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 357
 ggagccuc uguuccaaau ccugc 25
 <210> 358
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 358
 ggagccucu guuccaaauc cugca 25
 50 <210> 359
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 359
 60 gacgccucug uuccaaaucc ugcau 25
 <210> 360
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 360
 ccaauagugg ucaguccagg agcua 25
 5
 <210> 361
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 361
 15 caauaguggu caguccagga gcuag 25
 <210> 362
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 362
 aaauagugguc aguccaggag cuagg 25
 <210> 363
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 363
 auagugguca guccaggagc uaggu 25
 <210> 364
 40 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 364
 auagugguca guccaggagc u 21
 50 <210> 365
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 365
 60 uaguggucag uccaggagcu agguc 25
 <210> 366
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 366
 aguggucagu ccaggagcua gguca 25
 5
 <210> 367
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 367
 15 guggucaguc caggagcuag gucag 25
 <210> 368
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 368
 uggucagucc aggagcuagg ucagg 25
 <210> 369
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 369
 ggucagucca ggagcuaggu caggc 25
 <210> 370
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 370
 gucaguccag gagcuagguc aggcu 25
 50 <210> 371
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 371
 60 ucaguccagg agcuagguca ggcug 25
 <210> 372
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 372
caguccagga gcuaggucag gcugc 25

5

<210> 373
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

10

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 373
15 aguccaggag cuaggucagg cugcu 25

<210> 374
<211> 25
<212> ARN
20 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

25 <400> 374
guccaggagc uaggucaggc ugcuu 25

<210> 375
<211> 25
30 <212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

35 <400> 375
uccaggagcu aggucaggcu gcuuu 25

<210> 376
40 <211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
45 <223> oligonucleótido

<400> 376
ccaggagcua ggucaggcug cuuug 25

50 <210> 377
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

55 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 377
60 caggagcuag gucaggcugc uuugc 25

<210> 378
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 378
 5 aggagcuagg ucaggcugcu uugcc 25
 <210> 379
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 379
 15 ggagcuaggu caggcugcuu ugccc 25
 <210> 380
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 380
 gagcuagguc aggcugcuu gcccu 25
 <210> 381
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 381
 agcuagguca ggcugcuuug ccuc 25
 <210> 382
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 382
 gcuaggucag gcugcuuugc ccuca 25
 50 <210> 383
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 383
 60 cucagcucu gaaguaaacg guuua 25
 <210> 384
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 384
 cagcucuuga aguaaacggu uuacc 25
 5
 <210> 385
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 385
 15 gcucuugaag uaaacgguu accgc 25
 <210> 386
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 386
 cuaggucagg cugcuuugcc cucag 25
 <210> 387
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 387
 uaggucaggc ugcuuugccc ucagc 25
 <210> 388
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 388
 aggucaggcu gcuuugcccu cagcu 25
 50 <210> 389
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 389
 60 ggucaggcug cuuugcccuc agcuc 25
 <210> 390
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 390
 5 gucaggcugc uuugcccuca gcucu 25
 <210> 391
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 391
 15 ucaggcugcu uugcccucag cucuu 25
 <210> 392
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 392
 caggcugcuu ugcccucagc ucuug 25
 <210> 393
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 393
 aggcugcuuu gccucagcu cuuga 25
 <210> 394
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 394
 ggcugcuug cccucagcuc uugaa 25
 50 <210> 395
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 395
 60 gcugcuuugc ccucagcucu ugaag 25
 <210> 396
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 396
cugcuuugcc cucagcucu gaagu 25

5

<210> 397
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

10

<220>
<223> oligonucleótido

<400> 397
15 ugcuuugccc ucagcucuug aagua 25

<210> 398
<211> 25
<212> ARN
20 <213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

25 <400> 398
gcuuugcccu cagcucuuga aguaa 25

<210> 399
<211> 25
30 <212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido

35 <400> 399
cuuugcccuc agcucuugaa guaaa 25

<210> 400
40 <211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
45 <223> oligonucleótido

<400> 400
uuugcccuca gcucuugaag uaaac 25

50 <210> 401
<211> 25
<212> ARN
<213> Artificial

55 <220>
<223> oligonucleótido

<400> 401
60 uuugcccucag cucuugaagu aaacg 25

<210> 402
<211> 25
<212> ARN
65 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido
 <400> 402
 ugcccucagc ucuugaagua aacgg 25
 5
 <210> 403
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 403
 15 gcccucagcu cuugaagua acgg 25
 <210> 404
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 404
 cccucagcuc uugaaguaaa cgg 25
 <210> 405
 <211> 20
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 405
 ccucagcucu ugaaguaaac 20
 <210> 406
 40 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 406
 ccucagcucu ugaaguaaac g 21
 50 <210> 407
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 407
 60 cucagcucuu gaaguaaacg 20
 <210> 408
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 408
 ccucagcucu ugaaguaaac gguuu 25
 5
 <210> 409
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 409
 15 ucagcucuug aaguaaacgg uuuac 25
 <210> 410
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 410
 agcucuugaa guaaacggu uaccg 25
 <210> 411
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 411
 cucuugaagu aaacgguuuu ccgcc 25
 <210> 412
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 412
 ccacaggcgu ugcacuuugc aaugc 25
 50 <210> 413
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 413
 60 cacaggcguu gcacuuugca augcu 25
 <210> 414
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 414
 acaggcguug cacuuugcaa ugcug 25
 5
 <210> 415
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 415
 15 caggcguugc acuuugcaau gcugc 25
 <210> 416
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 416
 aggcguugca cuuugcaaug cugcu 25
 <210> 417
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 417
 ggcguugcac uuugcaaugc ugcug 25
 <210> 418
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 418
 gcguugcacu uugcaaugcu gcugu 25
 50 <210> 419
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 419
 60 cguugcacuu ugcaaugcug cuguc 25
 <210> 420
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 420
 cguugcacuu ugcaaugcug cug 23
 5
 <210> 421
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 421
 15 guugcacuuu gcaaugcugc ugucu 25
 <210> 422
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 422
 uugcacuuug caaugcugcu gucuu 25
 <210> 423
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 423
 ugacuuugc aaugcugcug ucuuc 25
 <210> 424
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 424
 gcacuuugca augcugcugu cuucu 25
 50 <210> 425
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 425
 60 cacuuugcaa ugcugcuguc uucuu 25
 <210> 426
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 426
 acuuugcaau gcugcugucu ucuug 25
 5
 <210> 427
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 427
 15 cuuugcaaug cugcugucuu cuugc 25
 <210> 428
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 428
 uuugcaaugc ugcugucuuc uugcu 25
 <210> 429
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 429
 uugcaaugcu gcugucuucu ugcua 25
 <210> 430
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 430
 ugcaaugcug cugucuucuu gcua 25
 50 <210> 431
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 431
 60 gcaaugcugc ugucuucuug cuaug 25
 <210> 432
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 432
 caaugcugcu gucuucugc uauga 25
 5
 <210> 433
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 433
 15 aaugcugcug ucuucugcu augaa 25
 <210> 434
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 434
 augcugcugu cuucugcua ugaa 25
 <210> 435
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 435
 ugcugcuguc uucugcuau gaaua 25
 <
 40 <210> 436
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 436
 gcugcugucu ucuugcuaug aauaa 25
 50 <210> 437
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 437
 60 cugcugucuu cuugcuauga auaau 25
 <210> 438
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 438
 ugcugucuuc uugcuaugaa uaau 25
 5
 <210> 439
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 439
 15 gcugucuucu ugcuugaau aaugu 25
 <210> 440
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 440
 cugucuucuu gcuugaaua auguc 25
 <210> 441
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 441
 ugucuucuu cuaugaaua uguca 25
 <210> 442
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 442
 gucuucugc uaugaaua u guca 25
 50 <210> 443
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 443
 60 ucuucugcu augaauaau ucaau 25
 <210> 444
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 444
 5 cuucuugcua ugaauaaugu cauc 25
 <210> 445
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 445
 15 uucuugcuau gaauaauguc aauc 25
 <210> 446
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 446
 ucuugcuaug aaauauguca aucc 25
 <210> 447
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 447
 cuugcuauga auaaugucua uccga 25
 <210> 448
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 448
 uugcuaugaa uaaugucaau ccgac 25
 50 <210> 449
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 449
 60 ugcuugaau aaugucaauc cgacc 25
 <210> 450
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 450
 5 gcuaugaaua augucaaucc gaccu 25
 <210> 451
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 451
 15 cuaugaauaa ugucaauccg accug 25
 <210> 452
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 452
 uaugaauaau gucaauccga ccuga 25
 <210> 453
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 453
 augaauaau ucaauccgac cugag 25
 <210> 454
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 454
 ugaauaau gucaauccgacc ugagc 25
 50 <210> 455
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 455
 60 gaauaauauguc aaucgaccu gagcu 25
 <210> 456
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 456
 aauaauguca auccgaccug agcuu 25
 5
 <210> 457
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 457
 15 auaaugucaa uccgaccuga gcuu 25
 <210> 458
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 458
 uaaugucaau ccgaccugag cuuug 25
 <210> 459
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 459
 aaugucaauc cgaccugagc uuugu 25
 <210> 460
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 460
 augucaaucc gaccugagcu uuguu 25
 50 <210> 461
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 461
 60 ugucaauccg accugagcu uguug 25
 <210> 462
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 462
 gucaauccga ccugagcuuu guugu 25
 5
 <210> 463
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 463
 15 ucaauccgac cugagcuuug uugua 25
 <210> 464
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 464
 caauccgacc ugagcuuugu uguag 25
 <210> 465
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 465
 aauccgaccu gagcuuuguu guaga 25
 <210> 466
 40 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 466
 auccgaccug agcuuuguug uagac 25
 50 <210> 467
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 467
 60 uccgaccuga gcuuuguugu agacu 25
 <210> 468
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 468
 ccgaccugag cuuuguugua gacua 25
 5
 <210> 469
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 469
 15 cgaccugagc uuuguuguag 20
 <210> 470
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 470
 cgaccugagc uuuguuguag acuau 25
 <210> 471
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 471
 gaccugagcu uuguuguaga cuauc 25
 <210> 472
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 472
 accugagcuu uguuguagac uauca 25
 50 <210> 473
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 473
 60 ccugagcuuu guuguagacu auc 23
 <210> 474
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido
 <400> 474
 cauuuuugac cuacaugugg 20
 5
 <210> 475
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 475
 15 uuugaccuac auguggaaag 20
 <210> 476
 <211> 26
 <212> ARN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 25 <400> 476
 uacauuuug accuacaugu ggaaag 26
 <210> 477
 <211> 17
 30 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 35 <400> 477
 ggucuccuua ccuauga 17
 <210> 478
 40 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido
 <400> 478
 ucuuaccuau gacuauggau gaga 24
 50 <210> 479
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido
 <400> 479
 60 auuuuugacc uacaugggaa ag 22
 <210> 480
 <211> 23
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 480
 5 uacgaguuga uugucggacc cag 23

 <210> 481
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 15 <400> 481
 guggucuccu uaccuaugac ugugg 25

 <210> 482
 <211> 24
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 482
 ugucucagua aucuucuac cuau 24

 <210> 483
 <211> 23
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 483
 ugcauguucc agucguugug ugg 23

 40 <210> 484
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 484
 50 cacuaaucca gucaaaauagg ucugg 25

 <210> 485
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 485
 60 auuuaccaac cuucaggauc gagua 25

 <210> 486
 <211> 21
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 486
 5 ggccuaaaac acauacacau a 21

 <210> 487
 <211> 24
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 487
 15 gauagguggu aucaacacuc guaa 24

 <210> 488
 <211> 21
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 488
 gauagguggu aucaacacuc g 21

 <210> 489
 <211> 19
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 489
 cuuccuggau ggcuugaau 19

 <210> 490
 <211> 20
 <212> ARN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 490
 50 uguuguuguu uaugcucauu 20

 <210> 491
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 491
 60 guacauuaag auggacuuc 19

 <210> 492
 <211> 20
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 492
 5 cuguugcagu aaucuaugag 20

 <210> 493
 <211> 20
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 493
 15 ugcaguaauc uaugaguuc 20

 <210> 494
 <211> 18
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 494
 gagucuucua ggagccuu 18

 <210> 495
 <211> 23
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 495
 ugccauuguu ucaucagcuc uuu 23

 <210> 496
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 496
 50 uccuguagga cauuggcagu 20

 <210> 497
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 497
 60 cuuggagucu ucuaggagcc 20

 <210> 498
 <211> 30
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 498
 5 ccauuuugug aauguuuucu uuugaacauc 30

 <210> 499
 <211> 24
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 499
 15 cccauuuugu gauguuuuc uuuu 24

 <210> 500
 <211> 24
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 500
 gaaaauugug cauuuaccca uuuu 24

 <210> 501
 30 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 501
 uugugcauuu acccauuuug ug 22

 <210> 502
 40 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> oligonucleótido

 <400> 502
 50 cccugaggca uucccaucuu gaau 24

 <210> 503
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 503
 60 aggacuuacu ugcuuuuuu 20

 <210> 504
 <211> 23
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 504
 5 cuugaauuuu ggagauucau cug 23

 <210> 505
 <211> 23
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 15 <400> 505
 caucuucuga uaauuuuccu guu 23

 <210> 506
 <211> 20
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 506
 ccuuuacagu ugucuguguu 20

 <210> 507
 30 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 507
 ugacagccug ugaaaucugu gag 23

 40 <210> 508
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 508
 50 uaaucugccu cuucuuuugg 20

 <210> 509
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 509
 60 cagcaguagu ugucaucugc 20

 <210> 510
 <211> 27
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 510
 5 gccugagcug aucugcuggc aucuugc 27

 <210> 511
 <211> 31
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 511
 15 gccugagcug aucugcuggc aucuugcagu u 31

 <210> 512
 <211> 16
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 512
 25 ucugcuggca ucuugc 16

 <210> 513
 <211> 22
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 513
 gccgguugac uucauccugu gc 22

 <210> 514
 <211> 23
 <212> ARN
 40 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 514
 50 gucugcaucc aggaacaugg guc 23

 <210> 515
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 515
 60 uacuuacugu cuguagcucu uucu 24

 <210> 516
 <211> 22
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 516
 5 cugcauccag gaacaugggu cc 22

 <210> 517
 <211> 24
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 15 <400> 517
 guugaagauc ugauagccgg uuga 24

 <210> 518
 <211> 17
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 518
 uaggugccug ccggcuu 17

 <210> 519
 30 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 519
 uucagcugua gccacacc 18

 40 <210> 520
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 520
 50 cugaacugcu ggaaagucgc c 21

 <210> 521
 <211> 30
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 521
 60 cuggcuucca aaugggaccu gaaaaagaac 30

 <210> 522
 <211> 21
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 522
 5 caauuuuucc cacucaguau u 21

 <210> 523
 <211> 19
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 15 <400> 523
 uugaaguucc uggagucuu 19

 <210> 524
 <211> 22
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 524
 uccucaggag gcagcucuaa au 22

 <210> 525
 <211> 16
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 525
 uggcucucuc ccaggg 16

 40 <210> 526
 <211> 27
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 526
 50 gagauggcuc ucuccaggg acccugg 27

 <210> 527
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 527
 60 gggcacuuug uuuggcg 17

 <210> 528
 <211> 19
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 528
 5 ggucccagca aguuguuug 19

 <210> 529
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 15 <400> 529
 ugggaugguc ccagcaagu guuug 25

 <210> 530
 <211> 21
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 530
 guagagcucu gucauuuugg g 21

 <210> 531
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 35
 <400> 531
 gcucaagaga uccacugcaa aaaac 25

 40 <210> 532
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 532
 50 gccauacgua cguaucauaa acauuc 26

 <210> 533
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 533
 60 ucugcaggau auccaugggc ugguc 25

 <210> 534
 <211> 27
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 534
 5 gauccucccu guucgucccc uauuaug 27

 <210> 535
 <211> 24
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 15 <400> 535
 ugcuuuagac uccuguaccu gaua 24

 <210> 536
 <211> 18
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido
 25
 <400> 536
 ggcggccuuu guguugac 18

 <210> 537
 30 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> oligonucleótido

 <400> 537
 ggacaggccu uuauguucgu gcugc 25

 40 <210> 538
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 538
 50 ccuuuauguu cgugcugcu 19

 <210> 539
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <400> 539
 60 ucaaggaaga uggcauuucu 20

 <210> 540
 <211> 20
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> I

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> n es a, c, g, o u

15 <400> 540
 ucaangaaga uggcauuucu 20

20 <210> 541
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> oligonucleótido

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> I

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g o u

40 <400> 541
 ucaagnaaga uggcauuucu 20

45 <210> 542
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> oligonucleótido

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (9) .. (9)
 <223> I

60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9) .. (9)
 <223> n es a, c, g o u

65 <400> 542
 ucaaggaana uggcauuucu 20

70 <210> 543
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

75 <220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> I
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> n es a, c, g o u
 10
 <400> 543
 ucaaggaaga ungcauuucu 20
 <210> 544
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> I
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n es a, c, g o u
 30
 <400> 544
 ucaaggaaga ugncauuucu 20
 35
 <210> 545
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> I
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n es a, c, g o u
 50
 <400> 545
 ncaaggaaga uggcauuucu 20
 55
 <210> 546
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 65

<223> l
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (11)..(11)
 <223> n es a, c, g o u
 <400> 546
 10 ucaaggaaga nggcuuucu 20
 <210> 547
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> oligonucleótido
 <220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> l
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n es a, c, g o u
 <400> 547
 30 ucaaggaaga uggcanuucu 20
 <210> 548
 <211> 20
 <212> ARN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> l
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 <223> n es a, c, g o u
 50 <400> 548
 ucaaggaaga uggcaunucu 20
 <210> 549
 <211> 20
 55 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> l
 65 <220>

<221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> n es a, c, g o u

5 <400> 549
ucaaggaaga uggcauuncu 20

<210> 550
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> oligonucleótido

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(20)
 <223> I

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g o u

25

<400> 550
 ucaaggaaga uggcauuucn 20

<210> 551
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> oligonucleótido

35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> I

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n es a, c, g o u

45

<400> 551
 ucnaggaaga uggcauuucu 20

50

<210> 552
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 <223> I

60

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> n es a, c, g o u

65

<400> 552
 ucanggaaga uggcauuucu 20

5 <210> 553
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada

15 <222> (7)..(7)
 <223> I

<220>
 <221> misc_feature

20 <222> (7)..(7)
 <223> n es a, c, g o u

<400> 553
 ucaaggnaga uggcauuucu 20

25 <210> 554
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada

35 <222> (8)..(8)
 <223> I

<220>
 <221> misc_feature

40 <222> (8)..(8)
 <223> n es a, c, g o u

<400> 554
 ucaagganga uggcauuucu 20

<210> 555
 <211> 20
 <212> ARN

50 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada

55 <222> (10)..(10)
 <223> I

<220>
 <221> misc_feature

60 <222> (10)..(10)
 <223> n es a, c, g o u

<400> 555
 ucaaggaagn uggcauuucu 20

<210> 556
 <211> 20
 <212> ARN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> I

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es a, c, g o u

 20 <400> 556
 ucaaggaaga uggcnuuucu 20

 <210> 557
 <211> 25
 25 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido

 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> I

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> n es a, c, g o u

 40 <400> 557
 uuugccncug cccaugcca uccug 25

 <210> 558
 <211> 25
 45 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 50 <223> oligonucleótido

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 55 <223> I

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 60 <223> n es a, c, g o u

 <400> 558
 uuugccgcun cccaugcca uccug 25

 65 <210> 559
 <211> 25

<212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 10 <223> I

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (17)..(17)
 15 <223> n es a, c, g o u

 <400> 559
 uuugccgcug cccauncca uccug 25

 20 <210> 560
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> oligonucleótido

 <220>
 <221> base_modificada
 30 <222> (4)..(4)
 <223> I

 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (4)..(4)
 <223> n es a, c, g o u

 <400> 560
 uuunccgcug cccaugcca uccug 25

 40 <210> 561
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> oligonucleótido

 <220>
 <221> base_modificada
 50 <222> (25) .. (25)
 <223> I

 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (25) .. (25)
 <223> n es a, c, g o u

 <400> 561
 60 uuugccgcug cccaugcca uccun 25

 <210> 562
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> l

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n e s a , c , g o u

15 <400> 562
 nuugccgcug cccaugcca uccug 25

<210> 563
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> l

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2) .. (2)
 <223> n e s a , c , g o u

35 <400> 563
 unugccgcug cccaugcca uccug 25

<210> 564
 <211> 25
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> l

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> n e s a , c , g o u

55 <400> 564
 uungccgcug cccaugcca uccug 25

<210> 565
 <211> 25
 60 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 65 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)..(9)
 <223> l
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g o u
 10
 <400> 565
 uuugccgcng cccaugcca uccug 25
 <210> 566
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)..(15)
 <223> l
 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> n es a, c, g o u
 30
 <400> 566
 uuugccgcug cccanugcca uccug 25
 35
 <210> 567
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)..(20)
 <223> l
 45
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g o u
 50
 <400> 567
 uuugccgcug cccaugccn uccug 25
 55
 <210> 568
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> oligonucleótido
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)
 65

<223> l
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (4)..(4)
 <223> n es a, c, g o u
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (7).. (7)
 <223> l
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (7)..(7)
 <223> n es a, c, g o u
 <400> 568
 20 uuunccncug cccaaugcca uccug 25
 <210> 569
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> oligonucleótido
 <220>
 30 <221> base_modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> l
 <220>
 35 <221> misc_feature
 <222> (16)..(16)
 <223> n es a, c, g o u
 <400> 569
 40 uuugccgcug cccaangcca uccug 25
 <210> 570
 <211> 25
 <212> ARN
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido
 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21) .. (21)
 <223> l
 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (21)
 <223> n es a, c, g o u
 60 <400> 570
 uuugccgcug cccaaugcca nccug 25
 <210> 571
 <211> 25
 65 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (24) .. (24)
 <223> l

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (24) .. (24)
 <223> n es a, c, g o u

15 <400> 571
 uuugccgcug cccaugcca uccng 25

<210> 572
 <211> 25

20 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> l

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> n es a, c, g o u

35 <400> 572
 uuugccgcug cccnaugcca uccug 25

<210> 573
 <211> 20

40 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(10)
 <223> l

50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n es a, c, g o u

<400> 573
 ucagcuucun uuagccacug 20

60 <210> 574
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> oligonucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 5 <223> I

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 10 <223> n es a, c, g o u

 <400> 574
 ucagcuucug uanccacug 20

 15 <210> 575
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> oligonucleótido

 <220>
 <221> base_modificada
 25 <222> (4)..(4)
 <223> I

 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (4)..(4)
 <223> n es a, c, g o u

 <400> 575
 ucancuucug uuagccacug 20
 35
 <210> 576
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido

 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (20)..(20)
 <223> I

 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (20)..(20)
 <223> n es a, c, g o u

 <400> 576
 55 ucagcuucug uuagccacun 20

 <210> 577
 <211> 153
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

 <400> 577

REIVINDICACIONES

- 5 1. Oligonucleótido antisentido que comprende al menos una inosina, donde el oligonucleótido comprende una secuencia dirigida al menos a parte de una parte de un exón de pre-ARNm de distrofina que es una extensión contigua que comprende al menos 13 nucleótidos y donde el oligonucleótido antisentido es capaz de realizar saltos de exón.
- 10 2. Oligonucleótido según la reivindicación 1, donde la extensión contigua comprende entre 13 y 50 nucleótidos, preferiblemente entre 14 y 25 nucleótidos, de ARN de un exón de un pre-ARNm de distrofina.
3. Oligonucleótido según la reivindicación 1 o 2, donde dicho exón comprende el exón 51, 45, 53, 44, 46, 52, 50 y/o 55.
- 15 4. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el oligonucleótido comprende ARN y donde preferiblemente dicho ARN contiene una modificación.
5. Oligonucleótido según la reivindicación 4, donde la modificación se selecciona de una ribosa modificada en 2'-O-metilo y una ribosa modificada en 2'-deoxi, preferiblemente la modificación es una ribosa modificada en 2'-O-metilo.
- 20 6. Oligonucleótido según la reivindicación 4, donde dicha modificación comprende una modificación de 2'-O-metilfosforotioato.
7. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho oligonucleótido comprende un ácido peptidonucleico, un ácido nucleico bloqueado, un morfolino fosforodiamidato o cualquier combinación de los mismos, de la forma más preferible morfolino fosforodiamidato.
- 25 8. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para ser usado como un medicamento, preferiblemente para prevenir o tratar la distrofia muscular de Duchenne o la distrofia muscular de Becker en un individuo.
- 30 9. Oligonucleótido según la reivindicación 8, donde el medicamento proporciona al individuo una proteína distrofina funcional y/o reduce al menos en parte la producción de una proteína distrofina aberrante y/o aumenta la producción de una proteína distrofina funcional o más funcional.
- 35 10. Oligonucleótido según la reivindicación 8 o 9, donde el medicamento alivia uno o varios síntoma(s) de la distrofia muscular de Duchenne o de la distrofia muscular de Becker en dicho individuo.
- 40 11. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el oligonucleótido está representado por una secuencia que comprende o consiste en cualquiera de las secuencias de base SEC ID N°:2 a 486 o 539, donde al menos una inosina está presente en dicha secuencia.
- 45 12. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde dicho oligonucleótido comprende o consiste en la base o secuencia de nucleótidos 5'-UUUGCCICUGCCCAAUGCCAUCCUG-3' (SEC ID N°:557).
13. Oligonucleótido antisentido consistente en la secuencia de base 5'-UUUGCCICUGCCCAAUGCCAUCCUG-3' (SEC ID N°:557), donde el oligonucleótido contiene fracciones de ribosa de 2'-O-metilo y tiene una estructura completa de fosforotioato.
- 50 14. Composición que comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, u 11 a 13, donde la composición es preferiblemente una composición farmacéutica, dicha composición farmacéutica que comprende un portador, adyuvante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55 15. Uso del oligonucleótido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 11 o de la composición tal y como se define en la reivindicación 14 para la fabricación de un medicamento para prevenir o tratar la distrofia muscular de Duchenne o la distrofia muscular de Becker en un individuo.
- 60 16. Método in vitro para el alivio de uno o varios síntoma(s) de la distrofia muscular de Duchenne o de la distrofia muscular de Becker en una célula, método que comprende administrar a dicha célula un oligonucleótido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o una composición tal y como se define en la reivindicación 14.

Fig 1

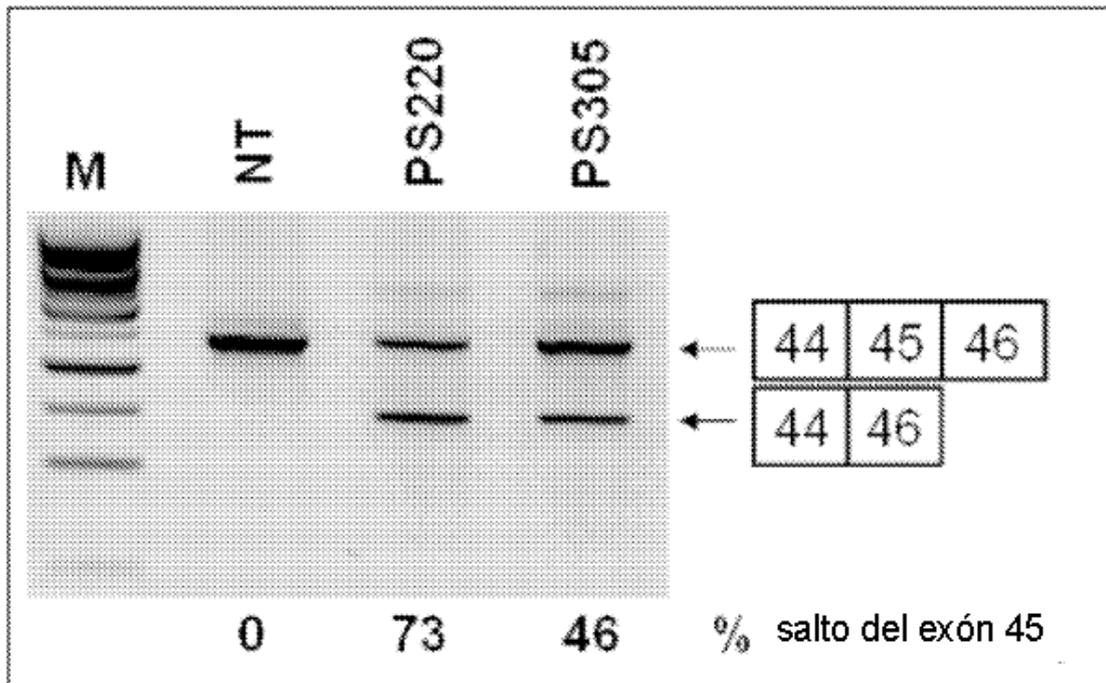
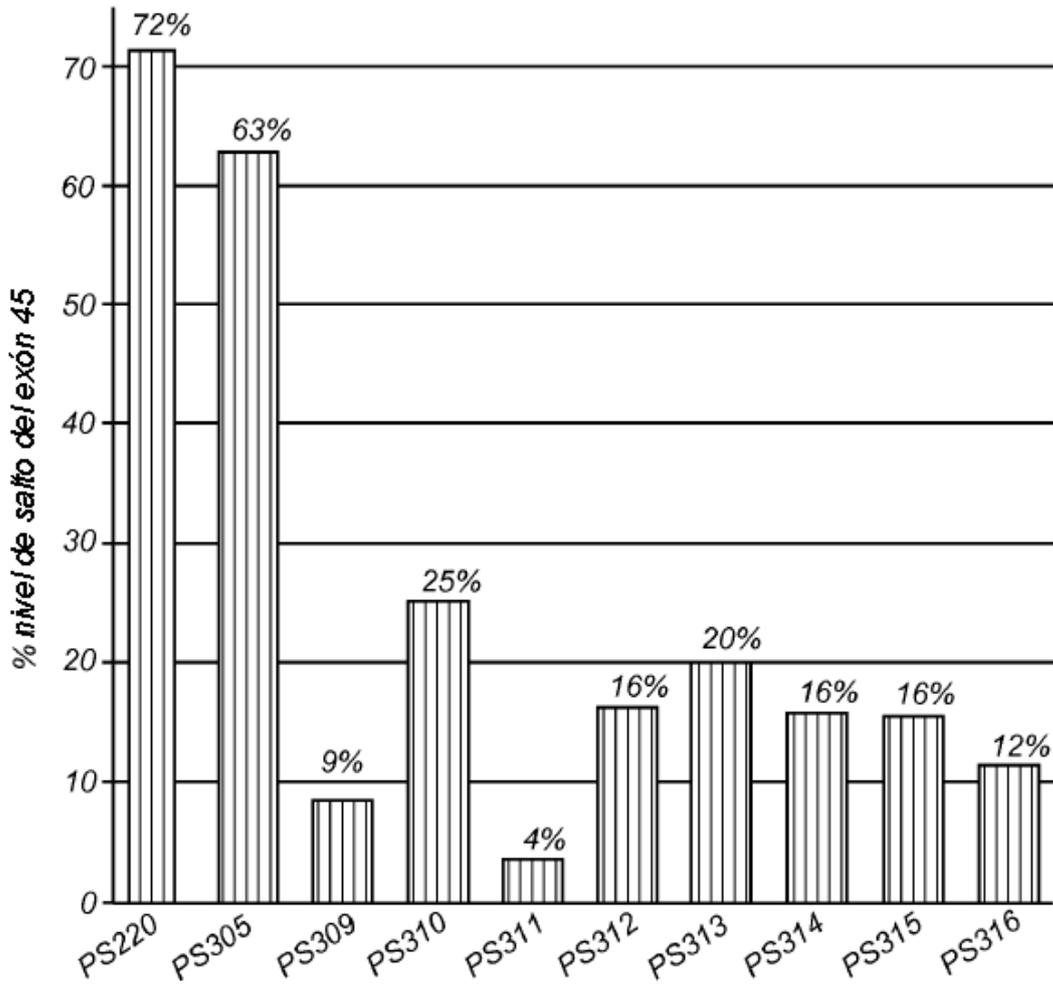


Fig 2



| AON ID | Secuencia (5' - 3') | SEC ID N°: |
|--------|---------------------------|---------------|
| PS220 | UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG | 76 |
| PS305 | UUUGCCICUGCCCAAUGCCAUCCUG | 557 |
| PS309 | UCAAGUUCUGACAACAGUUUGCCI | basada en 115 |
| PS310 | CAAUGUUCUGACAACAGUUUGCCIC | basada en 116 |
| PS311 | AAUGUUCUGACAACAGUUUGCCICU | basada en 117 |
| PS312 | AUGUUCUGACAACAGUUUGCCICUG | basada en 118 |
| PS313 | UGUUCUGACAACAGUUUGCCICUGC | basada en 119 |
| PS314 | GUUCUGACAACAGUUUGCCICUGCC | basada en 120 |
| PS315 | UUCUGACAACAGUUUGCCICUGCCC | basada en 121 |
| PS316 | UCUGACAACAGUUUGCCICUGCCCA | basada en 122 |