

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 610**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010 E 15188267 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3009150**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) por inhibición de transcrito antisentido natural para BDNF**

30 Prioridad:

12.02.2009 US 152132 P

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

25.05.2020

73 Titular/es:

**CURNA, INC. (100.0%)
4400 Biscayne Boulevard
Miami, FL 33137, US**

72 Inventor/es:

**COLLARD, JOSEPH;
KHORKOVA SHERMAN, OLGA y
COITO, CARLOS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 762 610 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

Tratamiento de enfermedades relacionadas con el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) por inhibición de transcrito antisentido natural para BDNF

5

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. N.º. 61/152.132 presentada el 12 de febrero de 2009.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10

Ejemplos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o función de BDNF y moléculas asociadas.

ANTECEDENTES

15

La hibridación de ADN-ARN y ARN-ARN es importante para muchos aspectos de la función del ácido nucleico que incluyen replicación, transcripción y traducción de ADN. La hibridación también es fundamental para una variedad de tecnologías que tanto detectan un ácido nucleico particular como alteran su expresión. Los nucleótidos antisentido, por ejemplo, alteran la expresión génica hibridándose con el ARN diana, interfiriendo así con el splicing, transcripción, traducción y replicación de ARN. El ADN antisentido tiene la característica añadida de que los híbridos de ADN-ARN sirven de sustrato para la digestión por ribonucleasa H, una actividad que está presente en la mayoría de los tipos celulares. Las moléculas antisentido pueden administrarse a células, como es el caso de los oligodesoxinucleótidos (ODN), o pueden expresarse a partir de genes endógenos como moléculas de ARN. La FDA aprobó recientemente un fármaco antisentido, VITRAVENE™ (para el tratamiento de retinitis por citomegalovirus), que refleja que el antisentido tiene utilidad terapéutica.

20

Pruunsild P et al. 2007 (Genomics, vol. 90(3):397-406) se refiere a la disección del locus de BDNF humano: transcripción bidireccional, splicing complejo y múltiples promotores.

30

Beiter T et al. 2008 (Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 66(1):94-112) se refiere a la transcripción antisentido:.

Liu Q-R et al. 2006 (Brain Research, vol. 1067(1):1-12) se refiere a genes BDNF de roedor, promotores novedosos, variantes de splicing novedosas y regulación por cocaína.

35

Liu Q-R et al. 2005 (American Journal of Medical Genetics, Parte B: Neuropsychiatric Genetics, vol. 134B(1):93-103) se refiere a genes factores neurotróficos derivados del cerebro (BDNF) humanos, patrones de splicing y evaluaciones de asociaciones con abuso de sustancias y enfermedad de Parkinson.

40

Liu Q-R et al. 2006 (International Journal of Developmental Neuroscience (Poster abstracts), vol. 24(8):559) se refiere a la regulación diferencial de genes BDNF/BDNFOS humanos sentido y antisentido y gen BDNF de roedor: posibles funciones en la enfermedad de Alzheimer y adicciones.

RESUMEN

45

La presente invención es como se define por las reivindicaciones. Aquellos aspectos/ casos de la presente divulgación que constituyen la invención se definen por las reivindicaciones.

50

Este resumen se proporciona para presentar un resumen de la divulgación para indicar brevemente la naturaleza y sustancia de la divulgación. Se presenta con el entendimiento de que no se utilizará para interpretar o limitar el alcance o significado de las reivindicaciones.

55

En un aspecto, la divulgación proporciona métodos de inhibición de la acción de un transcrito antisentido natural usando oligonucleótido(s) antisentido dirigido(s) a cualquier región del transcrito antisentido natural produciendo la regulación por incremento del gen sentido correspondiente. También se contempla en el presente documento que la inhibición del transcrito antisentido natural puede lograrse por siRNA, ribozimas y moléculas pequeñas, que se consideran que están dentro del alcance de la presente divulgación.

Un aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de BDNF en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un

oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 3175 de la SEQ ID NO: 2 (Figura 3), modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de BDNF en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

5 En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de BDNF, por ejemplo, nucleótidos expuestos en la SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como SEQ ID NOS: 3 a 8 (Figura 4).

10 Otro aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de BDNF en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de identidad de secuencia con un complemento inverso del antisentido del polinucleótido de BDNF; modulando así la
15 función y/o expresión del polinucleótido de BDNF en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

Otro aspecto proporciona un método de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de BDNF en células o tejidos de paciente *in vivo* o *in vitro* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50 % de
20 identidad de secuencia con un oligonucleótido antisentido para un polinucleótido de BDNF antisentido; modulando así la función y/o expresión del polinucleótido de BDNF en células o tejidos del paciente *in vivo* o *in vitro*.

En un aspecto preferido, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos de BDNF sentido y/o antisentido.

25 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden uno o más nucleótidos modificados o sustituidos.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden uno o más enlaces modificados.

30 En otro aspecto más, los nucleótidos modificados comprenden bases modificadas que comprenden fosforotioato, metilfosfonato, ácidos nucleicos peptídicos, 2'-O-metilo, fluoro- o carbono, metileno u otras moléculas de ácido nucleico bloqueado (LNA). Preferentemente, los nucleótidos modificados son moléculas bloqueadas de ácidos nucleicos, que incluyen α -L-LNA.

35 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se administran a un paciente subcutáneamente, intramuscularmente, intravenosamente o intraperitonealmente.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se administran en una composición farmacéutica. Una pauta de
40 tratamiento comprende administrar los compuestos antisentido al menos una vez al paciente; sin embargo, este tratamiento puede modificarse para incluir múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede combinarse con uno o varios de otros tipos de terapias.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos están encapsulados en un liposoma o unidos a una molécula
45 portadora (por ejemplo, colesterol, péptido TAT).

Otros aspectos se describen más adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50 Figura 1

Figura 1 A: es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de BDNF después del tratamiento de células HepG2 con los oligonucleótidos de fosforotioato del gámpero de LNA introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en
55 tiempo real muestran que los niveles de ARNm de BDNF en células HepG2 son significativamente elevados 48 h después del tratamiento con dos de los gámperos de LNA con esqueleto completamente fosforotioato diseñado para BDNF antisentido NM_170735 (CUR-0071, P=0,04, CUR-0073, P=0,07, CUR-0075, P=0,03). Las barras indicadas como CUR-0071, CUR-0072, CUR-0073, CUR-0074, CUR-0075 y CUR-0076 se corresponden con muestras tratadas con SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 3, 4 y 5, respectivamente.

Figura 1 B: es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestran el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de BDNF después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de BDNF antisentido fueron significativamente reducidos después del tratamiento con todos los oligos, excepto CUR-0072, lo que es posiblemente debido a que diferentes oligos afectan diferentes variantes de splicing de BDNF y/o BDNF antisentido NM_170735. Las barras indicadas como CUR-0071, CUR-0072, CUR-0073, CUR-0074, CUR-0075 y CUR-0076 se corresponden con muestras tratadas con SEQ ID NOS: 6, 7, 8, 3, 4 y 5, respectivamente.

Figura 1 C: es una gráfica de resultados de PCR en tiempo real que muestran el cambio en veces + desviación estándar en ARNm de BDNF después del tratamiento de células CHP212 con oligonucleótidos de fosforotioato del gápmero de LNA introducidos usando Lipofectamine - 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de BDNF en células CHP212 son significativamente elevados 48 h después del tratamiento con dos de los gápmeros de LNA con esqueleto completamente fosforotioatado diseñado para BDNF antisentido NM_170735. Las barras indicadas como CUR-0071, CUR-0072, y CUR-0076 se corresponden con muestras tratadas con SEQ ID NOS: 6, 7, y 3, respectivamente.

La Figura 2 muestra SEQ ID NO: 1: factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) de Homo sapiens, variante 1 de transcrito, ARNm. (Nº de acceso de NCBI: NM_170735) y la SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia genómica de BDNF (se muestran los exones en letras mayúsculas, los intrones en minúscula).

La Figura 3 muestra SEQ ID NO: 2: secuencia antisentido de BDNF natural (NR_002832.1), hebra opuesta de BDNF de Homo sapiens (que no codifica proteína) (BDNFOS), ARN no codificante.

La Figura 4 muestra los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NOS: 3 a 8. * indica enlace fosforotioato y + indica modificación de LNA.

La Figura 5 muestra SEQ ID NOS: 9 y 10.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Varios aspectos de la divulgación se describen a continuación con referencia a aplicaciones de ejemplos para ilustración. Debe entenderse que los numerosos detalles, relaciones y métodos específicos se exponen para proporcionar un entendimiento completo de la divulgación. Un experto en la materia relevante, sin embargo, reconocerá fácilmente que la divulgación puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros métodos. La presente divulgación no está limitada por el orden de actos o acontecimientos, ya que algunos actos pueden producirse en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros actos o acontecimientos. Además, no todos los actos o acontecimientos ilustrados son requeridos para implementar una metodología según la presente divulgación.

Todos los genes, nombres de genes y productos génicos descritos en el presente documento pretenden corresponderse con homólogos de cualquier especie para las que son aplicables las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Así, los términos incluyen, pero no se limitan a, genes y productos génicos de seres humanos y ratones. Se entiende que cuando se describe un gen o producto génico de una especie particular, la presente divulgación pretende ser a modo de ejemplo solo, y no debe interpretarse como una limitación, a menos que el contexto en el que aparece lo indique claramente. Así, por ejemplo, los genes descritos en el presente documento, que en algunos casos se refieren a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de mamífero, pretenden englobar genes homólogos y/u ortólogos y productos génicos de otros animales que incluyen, pero no se limitan a, otros mamíferos, peces, anfibios, reptiles y aves. En aspectos preferidos, los genes o secuencias de ácidos nucleicos son humanos.

Definiciones

La terminología usada en el presente documento es con el fin de describir aspectos particulares solo y no pretende ser limitante de la divulgación. Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, siempre que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con", o variantes de los mismos, se usen en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, tales términos pretenden ser incluyentes de un modo similar al término

“que comprende”.

El término “aproximadamente” significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular como se ha determinado por un experto habitual en la materia, lo que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, “aproximadamente” puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar, por la práctica en la materia. Alternativamente, “aproximadamente” puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente hasta el 10 %, más preferentemente hasta el 5 %, y aún más preferentemente hasta el 1 % de un valor dado. Alternativamente, particularmente con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces, de un valor. Si se describen valores particulares en la solicitud y reivindicaciones, a menos que se establezca de otro modo, debe asumirse que el término “aproximadamente” significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Como se usa en el presente documento, el término “ARNm” significa (el) los transcrito(s) de ARNm actualmente conocidos de un gen elegido como diana, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

Por “oligonucleótidos antisentido” o “compuesto antisentido” se entiende una molécula de ARN o de ADN que se une a otro ARN o ADN (ARN, ADN diana). Por ejemplo, si es un oligonucleótido de ARN se une a otra diana de ARN por medio de interacciones ARN-ARN y altera la actividad del ARN diana (Eguchi et al., (1991) Ann. Rev. Biochem. 60, 631-652). Un oligonucleótido antisentido puede regular por incremento o regular por disminución la expresión y/o función de un polinucleótido particular. La definición pretende incluir cualquier molécula de ARN o ADN foráneo que es útil desde un punto de vista terapéutico, diagnóstico, u otro punto de vista. Tales moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas de ARN o ADN antisentido, ARN de interferencia (iARN), microARN, moléculas de ARN señuelo, siRNA, ARN enzimático, ARN de edición terapéutica y ARN agonista y antagonista, compuestos oligoméricos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

En el contexto de la presente divulgación, el término “oligonucleótido” se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. El término “oligonucleótido” también incluye oligómeros lineales o circulares de monómeros o enlaces naturales y/o modificados, que incluyen desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, formas sustituidas y alfa-anómeras de los mismos, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), fosforotioato, metilfosfonato y similares. Los oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido diana a modo de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tales como tipo Watson-Crick de apareamiento de bases, tipos Hoogsteen o Hoögsteen inversa de apareamiento de bases, o similares.

El oligonucleótido puede ser “quimérico”, es decir, estar compuesto de diferentes regiones. En el contexto de la presente divulgación, los compuestos “quiméricos” son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicas, por ejemplo, región (regiones) de ADN, región (regiones) de ARN, región (regiones) de PNA, etc. Cada región química está constituida de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos normalmente comprenden al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica con el fin de presentar una o más propiedades deseadas. Las propiedades deseadas del oligonucleótido incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, elevada resistencia a la degradación por nucleasas, elevada captación celular y/o elevada afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Las diferentes regiones del oligonucleótido pueden, por tanto, tener diferentes propiedades. Los oligonucleótidos quiméricos de la presente divulgación pueden formarse como estructuras mixtas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o análogos de oligonucleótidos, como se ha descrito anteriormente.

El oligonucleótido puede estar compuesto de regiones que pueden enlazarse en “registro”, es decir, cuando los monómeros se enlazan consecutivamente, como en ADN nativo, o se enlazan mediante espaciadores. Los espaciadores pretenden constituir un “puente” covalente entre las regiones y tienen en aspectos preferidos una longitud que no supera aproximadamente 100 átomos de carbono. Los espaciadores pueden llevar diferentes funcionalidades, por ejemplo, tener carga positiva o negativa, llevar propiedades de unión a ácido nucleico especiales (intercaladores, ligantes de surcos, toxinas, fluoróforos, etc.), ser lipófilos, inducir estructuras secundarias especiales como, por ejemplo, péptidos que contienen alanina que inducen hélices alfa.

Como se usa en el presente documento, “BDNF” y “factor neurotrófico derivado de cerebro” incluyen todos los

miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, hebras de polinucleótidos sentido y antisentido, etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión 'factor neurotrófico derivado del cerebro' y BDNF se usan indistintamente en la presente solicitud.

Como se usa en el presente documento, el término "oligonucleótido específico para" u "oligonucleótido que se dirige a" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una porción del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana. La estabilidad de los complejos y dúplex puede determinarse por cálculos teóricos y/o ensayos *in vitro*. Ensayos a modo de ejemplo para determinar la estabilidad de complejos y dúplex de hibridación se describen en los ejemplos más adelante.

Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico diana" engloba ADN, ARN (que comprende preARNm y ARNm) transcrito a partir de tal ADN, y también ADNc derivado de tal ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos que hibridan específicamente con él, se denomina generalmente "antisentido". Las funciones de ADN que van a interferirse incluyen, por ejemplo, la replicación y transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. El efecto global de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

La interferencia de ARN "iARN" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (dsARN) que tienen homología específica de secuencia para sus secuencias de ácidos nucleicos "diana" (Caplen, N. J., et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747). En ciertos aspectos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de ARN "interferente pequeño" (siRNA) de 5-25 nucleótidos. Los siRNA se derivan del procesamiento de dsARN por una enzima RNasa conocida como Dicer (Bernstein E., et al. (2001) Nature 409:363-366). Los productos de dúplex de siRNA son reclutados en un complejo de ARNiP de multi-proteína llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), en el que el dúplex de siRNA interacciona en una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico (Bernstein, E., et al. (2001) Nature 409:363-366; Boutla, A., et al. (2001) Curr. Biol. 11:1776-1780). Los ARN interferentes pequeños que pueden usarse según la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse según procedimientos que son muy conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN interferentes pequeños para su uso en los métodos de la presente divulgación comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de aspectos no limitantes, los siRNA pueden comprender aproximadamente de 5 a aproximadamente 40 nt, aproximadamente de 5 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 10 a aproximadamente 30 nt, aproximadamente de 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Tales programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no se han secuenciado, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de astringencia variables, como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que presentan un alto grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos diana en un sujeto que va a controlarse y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente divulgación.

Por "ARN enzimático" se entiende una molécula de ARN con actividad enzimática (Cech, (1988) J. American. Med. Assoc. 260, 3030-3035). Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan uniéndose primero a un ARN diana. Tal unión se produce mediante la porción de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido

nucleico enzimático reconoce primero y luego se une a ARN diana mediante apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

Por “ARN señuelo” se entiende una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN
5 señuelo compete, por tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha
mostrado que la sobreexpresión del ARN de respuesta de activación en trans del VIH (TAR) puede actuar de
“señuelo” y se une eficazmente a la proteína tat del VIH, previniendo así que se una a secuencias de TAR
codificadas en el ARN del VIH (Sullenger et al. (1990) Cell, 63, 601- 608). Esto se entiende que es un ejemplo
10 específico. Aquellos en la materia reconocerán que esto es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros
aspectos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

Como se usa en el presente documento, el término “monómeros” normalmente indica monómeros enlazados por
enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que oscilan en tamaño de algunas
unidades monoméricas, por ejemplo, de aproximadamente 3-4, a aproximadamente varios cientos de unidades
15 monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos,
fosforoselenoato, fosforamidoato y similares, como se describe más completamente más adelante.

El término “nucleótido” cubre nucleótidos que existen de forma natural, además de nucleótidos que no existen de
forma natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que los diversos nucleótidos que se ha considerado
20 previamente “que no existen de forma natural” se han encontrado posteriormente en la naturaleza. Así, “nucleótidos”
incluye no solo las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos y
tautómeros heterocíclicos de las mismas. Ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que
contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-
deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-alquilil (C3-
25 C6)-citosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina,
isoguanina, inosina y los nucleótidos “que no existen de forma natural” descritos en Benner et al., patente de EE.UU.
Nº 5.432.272. El término “nucleótido” pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y
tautómeros de los mismos. Nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina,
timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos que existen de forma natural en relación con la
30 aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y
2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2nd Ed. (Freeman, San
Francisco, 1992), además de sus análogos.

“Análogos”, en referencia a nucleótidos, incluye nucleótidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o
35 restos de azúcar modificados (véase, por ejemplo, descrito generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs, John
Wiley, New York, 1980; Freier & Altmann, (1997) Nucl. Acid. Res., 25(22), 4429-4443, Toulme, J.J., (2001) Nature
Biotechnology 19:17-18; Manoharan M., (1999) Biochemica et Biophysica Acta 1489:117-139; Freier S. M., (1997)
Nucleic Acid Research, 25:4429-4443, Uhlman, E., (2000) Drug Discovery & Development, 3: 203-213, Herdewin P.,
(2000) Antisense & Nucleic Acid Drug Dev., 10:297-310); [3.2.0]bicicloarabinonucleósidos enlazados en 2'-O, 3'-C
40 (véase, por ejemplo, N.K Christensen., et al, (1998) J. Am. Chem. Soc., 120: 5458-5463; Prakash TP, Bhat B. (2007)
Curr Top Med Chem. 7(7):641-9; Cho EJ, et al. (2009) Annual Review of Analytical Chemistry, 2, 241-264). Tales
análogos incluyen nucleótidos sintéticos diseñados para potenciar propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad
del dúplex o tríplex, especificidad, o similares.

45 Como se usa en el presente documento, “hibridación” significa el apareamiento de hebras sustancialmente
complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica el enlace de hidrógeno, que
puede ser enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o de Hoogsteen inverso, entre bases de nucleósidos o
de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las hebras de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y
la timina son nucleótidos complementarios que aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. La
50 hibridación puede producirse bajo circunstancias variables.

Un compuesto antisentido es “específicamente hibridable” cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana
interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para producir una modulación de la función y/o actividad, y
hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a
55 secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, bajo
condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que se
realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, la expresión “condiciones de hibridación astringentes” o “condiciones

5 astringentes” se refiere a condiciones bajo las que un compuesto de la divulgación hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones astringentes son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y en el contexto de la presente divulgación, las “condiciones astringentes” bajo las que hibridan los compuestos oligoméricos con una secuencia diana se determinan por la naturaleza y composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que están siendo investigados. En general, las condiciones de hibridación astringentes comprenden bajas concentraciones (<0,15 M) de sales con cationes inorgánicas tales como Na⁺⁺ o K⁺⁺ (es decir, baja fuerza iónica), temperatura superior a 20 °C - 25 °C por debajo de la T_m del complejo de compuesto oligomérico:secuencia diana, y la presencia de desnaturalizantes tales como formamida, dimetilformamida, sulfóxido de dimetilo, o el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS). Por ejemplo, la velocidad de hibridación disminuye el 1,1 % por cada 1 % de formamida. Un ejemplo de una condición de hibridación de alta astringencia es 0,1X tampón cloruro sódico-citrato sódico (SSC)/0,1 % (peso/volumen) de SDS a 60 °C durante 30 minutos.

15 “Complementario”, como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos en una o dos hebras oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en una cierta posición de un compuesto antisentido es capaz de formar enlace de hidrógeno con una nucleobase en una cierta posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana un ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, entonces la posición de enlace del hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido adicional son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlace de hidrógeno entre ellos. Así, “específicamente hibridable” y “complementario” son términos que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad durante un número suficiente de nucleótidos de forma que se produzca la unión estable específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

25 Se entiende en la materia que la secuencia de un compuesto oligomérico no necesita ser 100 % complementaria a la de su ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. Además, un oligonucleótido puede hibridarse sobre uno o más segmentos de forma que segmentos intermedios o adyacentes no participen en el acontecimiento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, desapareamiento o estructura de horquilla). Los compuestos oligoméricos de la presente divulgación comprenden al menos aproximadamente el 70 %, o al menos aproximadamente el 75 %, o al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 85 %, o al menos aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 99 %, de complementariedad de secuencia con una región diana dentro de la secuencia de ácidos nucleicos diana a la que se dirigen. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de los 20 nucleótidos del compuesto antisentido son complementarios a una región diana, y, por tanto, hibridarían específicamente, representaría el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, los nucleótidos no complementarios restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleótidos complementarios y no necesitan ser contiguos entre sí o a nucleótidos complementarios. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleótidos de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleótidos no complementarios que están flanqueados por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendría el 77,8 % de complementariedad global con el ácido nucleico diana y así entraría dentro del alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básicos) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol., 215, 403-410; Zhang y Madden, (1997) Genome Res., 7, 649-656). La homología en porcentaje, identidad de secuencias o complementariedad pueden determinarse por, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), usando parámetros por defecto, que usa el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., (1981) 2, 482-489).

50 Como se usa en el presente documento, el término “punto de fusión térmico (T_m)” se refiere a la temperatura, bajo fuerza iónica definida, pH y concentración de ácido nucleico, a la que el 50 % de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Normalmente, condiciones astringentes serán aquellas en las que la concentración de sales es la concentración de ion Na (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 30 °C para oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones astringentes con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida.

Como se usa en el presente documento, “modulación” significa tanto un aumento (estimulación) como una disminución (inhibición) en la expresión de un gen.

El término “variante”, cuando se usa en el contexto de una secuencia de polinucleótidos, puede englobar una secuencia de polinucleótidos relacionada con un gen no mutante. Esta definición también puede incluir, por ejemplo, variantes “alélicas”, de “splicing”, de “especie” o “polimórficas”. Una variante de splicing puede tener identidad significativa con una molécula de referencia, pero generalmente tendrá un mayor o menor número de polinucleótidos debido al splicing alterativo de exones durante el procesamiento de ARNm. El polipéptido correspondiente puede poseer dominios funcionales adicionales o una ausencia de dominios. Las variantes de especie son secuencias de polinucleótidos que varían de una especie a otra. Son de particular utilidad en la divulgación de productos génicos no mutantes (wild type). Las variantes pueden resultar de al menos una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos y pueden producir ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función puede o puede no alterarse. Cualquier gen natural o recombinante dado puede tener ninguna, una o muchas formas alélicas. Cambios mutacionales comunes que dan lugar a variantes se atribuyen generalmente a deleciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede producirse solo, o en combinación con los otros, una o más veces en una secuencia dada.

Los polipéptidos resultantes generalmente tendrán identidad significativa de aminoácidos los unos con respecto a los otros. Una variante polimórfica es una variación en la secuencia de polinucleótidos de un gen particular entre individuos de una especie dada. Las variantes polimórficas también pueden englobar “polimorfismos de un solo nucleótido” (SNP), o mutaciones de una sola base en las que la secuencia de polinucleótidos varía una base. La presencia de SNP puede ser indicativa de, por ejemplo, una cierta población con una propensión por un estado de enfermedad, que es susceptibilidad frente a resistencia.

Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, por ejemplo, oligonucleótidos derivados, pueden comprender porciones que no existen de forma natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces inter-azúcar. A modo de ejemplo, entre éstos están fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados también pueden contener etiquetas, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido “derivado” es uno que se modifica, por ejemplo, por glicosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado también puede modificarse para contener una etiqueta detectable, tanto directa como indirectamente, que incluye, pero no se limita a, un radioisótopo, etiqueta fluorescente y enzimática.

Como se usa en el presente documento, el término “animal” o “paciente” pretende incluir, por ejemplo, seres humanos, ovejas, alces, venados, ciervos mulos, visones, mamíferos, monos, caballos, ganado vacuno, cerdos, cabras, perros, gatos, ratas, ratones, aves, pollo, reptiles, peces, insectos y arácnidos.

“Mamífero” cubre mamíferos de sangre caliente que normalmente están bajo cuidado médico (por ejemplo, seres humanos y animales domesticados). Ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y humanos, además de solo humanos.

“Tratar” o “tratamiento” cubre el tratamiento de un estado de enfermedad en un mamífero, e incluye: (a) prevenir que se produzca el estado de enfermedad en un mamífero, en particular, cuando tal mamífero tiene predisposición al estado de enfermedad, pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir el estado de enfermedad, por ejemplo, detener el desarrollo; y/o (c) aliviar el estado de enfermedad, por ejemplo, causando la regresión del estado de enfermedad hasta que se alcance un punto final deseado. Tratar también incluye la mejora de un síntoma de una enfermedad (por ejemplo, reducir el dolor o molestia), en el que tal mejora puede o puede no afectar directamente la enfermedad (por ejemplo, causa, transmisión, expresión, etc.).

Como se usa en el presente documento, el término “cáncer” se refiere a cualquier tumor maligno, particularmente que surge en el pulmón, riñón o tiroides. El propio cáncer se manifiesta como un “tumor” o tejido que comprende células malignas del cáncer. Ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas tales como, pero no se limitan a: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesoteliooma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabiomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares,

cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma. Como se observa anteriormente, la divulgación permite específicamente el diagnóstico diferencial de tumores de pulmón, riñón y tiroides.

Composiciones y moléculas de polinucleótido y oligonucleótido

10

Dianas: En un aspecto, las dianas comprenden secuencias de ácidos nucleicos de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), que incluyen sin limitación secuencias no codificantes y/o codificantes sentido y/o antisentido asociadas a BDNF.

15 Las neurotrofinas son una clase de factores de crecimiento estructuralmente relacionados que promueven la supervivencia y diferenciación neural. Estimulan el crecimiento hacia afuera de neuritas, sugiriendo que pueden promover la regeneración de neuronas lesionadas, y actúan de factores neurotróficos derivados de diana para estimular la germinación colateral en tejidos diana que producen la neurotrofina (Korsching., (1993) J. Neurosci., 13: 2739). El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) se caracterizó inicialmente como una proteína básica presente en extractos de cerebro y capaz de aumentar la supervivencia de ganglios de la raíz dorsal (Leibrock., et al., (1989) Nature, 341:149). Cuando la comunicación axonal con el cuerpo de la célula se interrumpe por lesión, las células de Schwann producen factores neurotróficos tales como factor de crecimiento nervioso (NGF) y BDNF. Las neurotrofinas son liberadas de las células de Schwann y se dispersan de forman difusa en modo de gradiente alrededor de los axones en regeneración, que entonces se extienden distalmente a lo largo del gradiente de densidad de neurotrofinas (Ide., (1996) Neurosci. Res., 25:101). Se ha mostrado que la aplicación local de BDNF a nervios cortados transversalmente en ratas neonatales previene la muerte masiva de neuronas motoras que sigue a axotomía (DiStefano., et al., (1992) Neuron, 8:983; Oppenheim., et al., (1992) Nature, 360:755; Yan., et al., (1992) Nature, 360:753). El título de ARNm de BDNF aumenta a varias veces el nivel normal cuatro días después de la axotomía y alcanza su máximo a las 4 semanas (Meyer., et al., (1992) J. Cell Biol. 119:45). Además, se ha descrito que BDNF potencia la supervivencia de neuronas colinérgicas en cultivo (Nonomura, et al., (1995) Cerebro Res. 683:129).

Enfermedades y trastornos mediados por el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) a modo de ejemplo que pueden tratarse con células/tejidos regenerados de células madre obtenidos usando los compuestos antisentido comprenden: una enfermedad o un trastorno asociado a neurogénesis defectuosa; una enfermedad o trastorno neurodegenerativo (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, etc.); un trastorno neuropsiquiátrico (depresión, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo y trastorno delirante; trastornos de ansiedad tales como trastorno de pánico, fobias (incluyendo agorafobia), un trastorno obsesivo-compulsivo, un trastorno por estrés postraumático, un trastorno bipolar, anorexia nerviosa, bulimia nerviosa, un trastorno autoinmunitario (por ejemplo, esclerosis múltiple) del sistema nervioso central, pérdida de memoria, un trastorno de la memoria a largo plazo o a corto plazo, falta de memoria benigna, un trastorno del aprendizaje en la infancia, lesión cerrada de la cabeza, un trastorno de déficit de atención, reacción neuronal a infección viral, daño cerebral, narcolepsia, un trastorno del sueño (por ejemplo, trastornos de los ritmos circadianos, insomnio y narcolepsia); rotura de nervios o daño nervioso, rotura del tronco nervioso cerebroespinal (CNS) y un daño al cerebro o células nerviosas, un déficit neurológico asociado al SIDA, un trastorno motor y de tics caracterizado por tics motores y/o vocales (por ejemplo, trastorno de Tourette, trastorno motor o de tics vocales crónico, trastorno de tics transitorio y trastorno de movimientos estereotípicos), un trastorno por abuso de sustancias (por ejemplo, dependencia de sustancias, abuso de sustancias y las secuelas del abuso/dependencia de sustancias, tales como trastorno psicológico inducido por sustancias, abstinencia de sustancias y demencia inducida por sustancias o trastorno amnésico), lesión cerebral traumática, acúfenos, neuralgia (por ejemplo, neuralgia del trigémino), dolor (por ejemplo, dolor crónico, dolor inflamatorio crónico, dolor asociado a artritis, fibromialgia, dolor de espalda, dolor asociado al cáncer, dolor asociado a enfermedad digestiva, dolor asociado a enfermedad de Crohn, dolor asociado a enfermedad autoinmunitaria, dolor asociado a enfermedad endocrina, dolor asociado a neuropatía diabética, dolor del miembro fantasma, dolor espontáneo, dolor crónico postquirúrgico, dolor crónico temporomandibular, causalgia, neuralgia post-herpética, dolor relacionado con el SIDA, síndromes de dolor regional complejo tipo I y II, neuralgia del trigémino, dolor de espalda crónico, dolor asociado a lesión de la médula espinal, dolor asociado a la ingesta de fármacos y dolor agudo recurrente, dolor neuropático), actividad neuronal inapropiada que produce neurodistesias en una enfermedad tal como diabetes, una EM y una enfermedad de las neuronas motoras, ataxias, rigidez muscular (espasticidad), disfunción de la articulación

temporomandibular, síndrome de deficiencia de Reward (RDS), neurotoxicidad producida por alcohol o abuso de sustancias (por ejemplo, ecstasia, metanfetamina etc.), retraso mental o deterioro cognitivo (por ejemplo, retraso mental no sindrónico ligado a X, síndrome del X frágil, síndrome de Down, autismo), afasia, parálisis de Bell, enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, encefalitis, degeneración macular senil, síndrome de Ondina, síndrome de WAGR, sordera parcial, síndrome de Rett, epilepsia, lesión de la médula espinal, accidente cerebrovascular, hipoxia, isquemia, lesión cerebral, lesión del nervio óptico, neuropatía diabética, neuropatía periférica, complicaciones del trasplante de nervios, enfermedad de las neuronas motoras, lesión nerviosa periférica, obesidad, un síndrome metabólico, cáncer, asma, una enfermedad atópica, una inflamación alérgica, eccema, una enfermedad o trastorno neuro-oncológico, enfermedad o trastorno neuro-inmunológico y enfermedad o trastorno neuro-otológico; y una enfermedad o trastorno asociado al envejecimiento y senescencia.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de BDNF, que incluyen, sin limitación regiones no codificantes. Las dianas de BDNF comprenden variantes de BDNF o BDNFOS; mutantes de BDNF o BDNFOS, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de BDNF; alelos, fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

Según aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a polinucleótidos de BDNF solos, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de BDNF.

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural (antisentido natural para las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de BDNF, que incluyen, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN o de ADN antisentido.

En otro aspecto preferido, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina, citidina u otros nucleótidos naturales o no naturales en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones del compuesto antisentido. Estos compuestos se prueban entonces usando los métodos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 %.

Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para producir una pérdida de actividad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica. Tales condiciones incluyen, es decir, condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y condiciones en las que se realizan los ensayos en el caso de ensayos *in vitro*.

Un compuesto antisentido, tanto ADN, ARN, quimérico, sustituido, etc., es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o de ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

En otro aspecto preferido, el direccionamiento de BDNF que incluye, sin limitación, secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como SEQ ID NO: 2, y similares, modulan la expresión o función de BDNF. En un aspecto, la expresión o función está

regulada por incremento en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función se regula por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos expuestas como SEQ ID NOS: 3 a 8 que incluye secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente indicados, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no necesita describirse aquí.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también se emplea por aquellos expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como entidades terapéuticas en el tratamiento de estados de enfermedad en animales y el hombre. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. Así, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en pautas de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

En aspectos de la presente divulgación, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de ácidos nucleicos diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un gen diana. Las funciones de ADN que van a interferirse comprenden, por ejemplo, replicación y transcripción. Las funciones de ARN que van a interferirse comprenden todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, traducción de proteína desde ARN, splicing del ARN para dar una o más especies de ARNm, y actividad catalítica que puede acoplarse en o facilitarse por el ARN. Las funciones pueden regularse por incremento o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

Los compuestos antisentido incluyen compuestos antisentido oligoméricos, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), agentes de splicing alternativos, cebadores, sondas, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana. Como tales, estos compuestos pueden introducirse en forma de compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, parcialmente monocatenarios, o circulares.

El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de la presente divulgación, puede ser un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o estado de enfermedad particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente divulgación, el ácido nucleico diana codifica el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

El proceso de direccionamiento normalmente también incluye la determinación de al menos una región diana, segmento, o sitio dentro del ácido nucleico diana para que la interacción antisentido se produzca de forma que resulte el efecto deseado, por ejemplo, la modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente divulgación, el término "región" se define como una porción del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de ácidos nucleicos diana están segmentos. Los "segmentos" se definen como porciones más pequeñas o sub-porciones de regiones dentro de un ácido nucleico diana. "Sitios", como se usa en la presente divulgación, se define como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y modulan la expresión y/o función del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (SEQ ID NO: 1). Ejemplos de secuencias antisentido incluyen SEQ ID NOS: 2 a 8.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y modulan la expresión y/o función del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de polinucleótidos sentido o antisentido del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) modula la expresión y/o función del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

En otro aspecto preferido, los compuestos de oligonucleótido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NOS: 3 a 8, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente indicados, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, también es en sí conocida y no necesita describirse aquí.

Ya que, como se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción normalmente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcrito; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se denomina el "codón AUG", el "codón de iniciación" o el "codón de iniciación AUG". Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha mostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan *in vivo*. Así, los términos "codón de iniciación de la traducción" y "codón de iniciación" pueden englobar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso normalmente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de iniciación alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferencialmente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o bajo un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, "codón de iniciación" y "codón de iniciación de la traducción" se refieren al codón o codones que se usan *in vivo* para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), independientemente de la(s) secuencia(s) de tales codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Los términos "región de codón de iniciación" y "región de codón de iniciación de la traducción" se refieren a una porción de un ARNm tal o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de iniciación de la traducción. Similarmente, los términos "región de codón de terminación" y "región de codón de terminación de la traducción" se refieren a una porción de un ARNm tal o gen que engloba de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción. Por consiguiente, la "región de codón de iniciación" (o "región de codón de iniciación de la traducción") y la "región de codón de terminación" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser eficazmente dirigidas como diana con los compuestos antisentido de la presente divulgación.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede ser eficazmente elegida como diana. Dentro del contexto de la presente divulgación, una región elegida como diana es la región intragénica que engloba el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

Otra región diana incluye la región no traducida 5' (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción, y que así incluye nucleótidos entre el sitio 5' cap y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Todavía otra región diana incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que así incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio 5' cap de un ARNm comprende un residuo de guanósina N7-metilado unido al residuo 5'-most del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. La región 5' cap de un ARNm se considera que incluye la propia estructura 5' cap, además de los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio cap. Otra región diana para la presente divulgación es la región 5' cap.

Aunque algunos ARNm transcritos eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se escinden de un transcrito antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y, por tanto, traducidas) se conocen como "exones" y se cortan y empalman juntas para formar una secuencia de ARNm continua. En un caso, el direccionamiento de sitios de splicing, es decir, empalmes intrón-exón o empalmes exón-intrón, es particularmente útil en situaciones en las que el splicing aberrante participa en la enfermedad, o en las que una producción en exceso de un producto de splicing particular participa en la enfermedad. Un empalme de fusión aberrante debido a la transposición o delección es otro caso de un sitio diana. Los ARNm transcritos producidos mediante el proceso de splicing de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcritos de fusión". Los intrones pueden ser eficazmente direccionados usando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a regiones codificantes y/o no codificantes de un polinucleótido diana y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a polinucleótidos antisentido naturales y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a polinucleótidos sentido y modulan la expresión y/o función de la molécula diana.

Pueden producirse transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos son generalmente conocidos como "variantes". Más específicamente, "variantes de pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que se diferencian de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de parada y contienen tanto secuencia intrónica como exónica.

Tras la escisión de una o más regiones de exón o intrón, o porciones de las mismas durante el splicing, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. Por consiguiente, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única siempre debe producir una variante de ARNm única como resultado del splicing. Estas variantes de ARNm también se conocen como "variantes de splicing alternativas". Si no se produce splicing de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

Las variantes pueden producirse mediante el uso de señales alternativas para la transcripción de inicio o de parada. Los Pre-ARNm y ARNm pueden poseer más de un codón de iniciación o codón de terminación. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de iniciación alternativos se conocen como "variantes de inicio alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Aquellos transcritos que usan un codón de terminación alternativo se conocen como "variantes de parada alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la "variante de poliA", en la que los múltiples transcritos producidos resultan de la selección alternativa de una de las "señales de parada de poliA" por la maquinaria de transcripción, produciendo así transcritos que terminan en sitios de poliA únicos. Dentro del contexto de la divulgación, los tipos de variantes descritos en el presente documento también son casos de ácidos nucleicos diana.

Las localizaciones en el ácido nucleico diana con las que los compuestos antisentido hibridan se definen como al menos una porción de 5 nucleótidos de longitud de una región diana a la que se dirige un compuesto antisentido activo.

Aunque las secuencias específicas de ciertos segmentos diana a modo de ejemplo se exponen en el presente documento, un experto en la materia reconocerá que éstas sirven para ilustrar y describir casos particulares dentro del alcance de la presente divulgación. Segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por un experto habitual en la materia en vista de la presente divulgación.

Se considera que segmentos diana de 5-100 nucleótidos de longitud que comprenden un estiramiento de al menos cinco (5) nucleótidos consecutivos seleccionados de dentro de los segmentos diana preferidos también son adecuados para el direccionamiento.

Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un estiramiento consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente aguas arriba del

extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Segmentos diana similarmente preferidos se representan por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un estiramiento consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente aguas abajo del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contenga aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia armado con los segmentos diana ilustrados en el presente documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar segmentos diana preferidos adicionales.

10 Una vez se han identificado una o más regiones diana, segmentos o sitios, se eligen compuestos antisentido que son suficientemente complementarios a la diana, es decir, hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado.

En aspectos de la divulgación, los oligonucleótidos se unen a una hebra antisentido de una diana particular. Los oligonucleótidos tienen al menos 5 nucleótidos de longitud y pueden sintetizarse de manera que cada oligonucleótido se dirija a secuencias solapantes de forma que los oligonucleótidos se sintetizan para cubrir la longitud entera del polinucleótido diana. Las dianas también incluyen regiones codificantes, además de no codificantes.

En un aspecto, se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos por oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular es un proceso multietapa. El proceso normalmente empieza con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función va a modularse. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o estado de enfermedad particular, o un polinucleótido no codificante tal como, por ejemplo, ARN no codificante (ARNnc).

Los ARN pueden clasificarse en (1) ARN mensajeros (ARNm), que se traducen en proteínas, y (2) ARN no codificantes de proteína (ARNnc). Los ARNnc comprenden microARN, transcritos antisentido y otras unidades transcripcionales (TU) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carecen de cualquier amplio "marco de lectura abierto". Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de iniciación en regiones no traducidas 3' (3'UTRs) de loci codificante de proteína. Los ARNnc son frecuentemente raros y al menos la mitad de los ARNnc que se han secuenciado por el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han basado por motivos obvios en ARNm poliadenilados que se procesan y se exportan al citoplasma. Recientemente, se mostró que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de tales transcritos surgen de las llamadas regiones intergénicas (Cheng, J. et al. (2005) Science 308 (5725), 1149-1154; Kapranov, P. et al. (2005). Genome Res 15 (7), 987-997). El mecanismo por el que los ARNnc pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la misma localización genética, pero en la hebra opuesta a los ARN en los que actúan y, por tanto, muestran complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una localización cromosómica distinta de los ARN en los que actúan y generalmente no presentan potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

Sin desear ceñirse a ninguna teoría, la perturbación de un polinucleótido antisentido por los oligonucleótidos antisentido descritos en el presente documento puede alterar la expresión de los ARN mensajero sentido correspondientes. Sin embargo, esta regulación puede tanto ser discordante (la inactivación antisentido produce elevación de ARN mensajero) como concordante (la inactivación antisentido produce reducción concomitante de ARN mensajero). En estos casos, los oligonucleótidos antisentido pueden ser dirigidos a partes solapantes o no solapantes del transcrito antisentido que producen su inactivación o secuestro. El antisentido codificante, además de no codificante, puede ser dirigido de una manera idéntica y que cualquier categoría es capaz de regular los transcritos sentido correspondientes - tanto de una manera concordante como discordante. Las estrategias que se emplean en identificar nuevos oligonucleótidos para su uso contra una diana pueden basarse en la inactivación de transcritos de ARN antisentido por oligonucleótidos antisentido o cualquier otro medio de modulación de la diana deseada.

55 *Estrategia 1:* En el caso de regulación discordante, la inactivación del transcrito antisentido eleva la expresión del gen convencional (sentido). Si el último debe codificar un fármaco diana conocido o supuesto, entonces la inactivación de su homólogo antisentido podría imitar posiblemente la acción de un agonista receptor o una enzima estimulante.

Estrategia 2: En el caso de regulación concordante, podrían inactivarse concomitantemente tanto los transcritos antisentido como sentido y así lograr una reducción sinérgica de la expresión génica (sentido) convencional. Si, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido se usa para lograr la inactivación, entonces esta estrategia puede usarse para aplicar un oligonucleótido antisentido dirigido al transcrito sentido y otro oligonucleótido antisentido al transcrito antisentido correspondiente, o un único oligonucleótido antisentido energéticamente simétrico que se dirige simultáneamente a transcritos sentido y antisentido solapantes.

Según la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan rutinariamente linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos hebras hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única hebra con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos hebras pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Alternativamente, las dos hebras pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Así, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos casos, la expresión génica o función está regulada por incremento. Cuando se forma a partir de dos hebras, o una única hebra que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos hebras (o regiones formadoras de dúplex de una sola hebra) son hebras de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

Una vez introducido a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como "similares a ADN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o "similares a ARN" (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son "similares a ADN" y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son "similares a ARN". En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos deseados o compuestos antisentido comprenden al menos uno de: ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); un microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc); activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); ARN activantes pequeños (ARNap), o combinaciones de los mismos.

Los dsARN también pueden activar la expresión génica, un mecanismo que se ha llamado "activación génica inducida por ARN pequeño" o aARN. Los promotores génicos que se dirigen a dsARN inducen la potente activación transcripcional de genes asociados. El aARN se demostró en células humanas usando dsARN sintéticos, llamados "ARN activantes pequeños" (ARNap). No se sabe actualmente si el aARN está conservado en otros organismos.

Se ha encontrado que el ARN bicatenario pequeño (dsARN), tal como ARN interferente pequeño (siRNA) y microARN (miARN), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia de ARN (iARN). La iARN conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para así suprimir la transcripción, degradación de ARNm complementario, o bloqueo de la traducción

de proteína. Sin embargo, en los casos descritos en detalle en la sección de ejemplos que sigue, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y productos codificados por los mismos. Los dsARN también pueden actuar de ARN activantes pequeños (ARNap). Sin desear ceñirse a ninguna teoría, direccionando secuencias a promotores génicos, los ARNap inducirán la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por dsARN (aARN).

En otro aspecto, los “segmentos diana preferidos” identificados en el presente documento pueden emplearse en un cribado para compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). “Moduladores” son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y que comprenden al menos una porción de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El método de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), por ejemplo, SEQ ID NOS: 3 a 8. Una vez se muestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), o para su uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico según la presente divulgación.

El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen BDNF (por ejemplo, número de acceso NM_170735, Fig. 2). En un aspecto preferido, la diana es un polinucleótido antisentido del gen BDNF. En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias sentido y/o antisentido naturales de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (por ejemplo, número de acceso NM_170735, Fig. 2), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o sentido de BDNF.

Los segmentos diana preferidos de la presente divulgación también pueden combinarse con sus compuestos antisentido complementarios respectivos de la presente divulgación para formar oligonucleótidos (duplexados) bicatenarios estabilizados.

Se ha mostrado en la materia que tales restos de oligonucleótido bicatenario modulan expresión de diana y regulan la traducción, además del procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden someterse a modificaciones químicas (Fire et al., (1998) *Nature*, 391, 806-811; Timmons and Fire, (1998) *Nature*, 395, 854; Timmons et al., (2001) *Gene*, 263, 103-112; Tabara et al., (1998) *Science*, 282, 430-431; Montgomery et al., (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 15502-15507; Tuschl et al., (1999) *Genes Dev.*, 13, 3191-3197; Elbashir et al., (2001) *Nature*, 411, 494-498; Elbashir et al., (2001) *Genes Dev.* 15, 188-200). Por ejemplo, se ha mostrado que tales restos bicatenarios inhiben la diana por la hibridación clásica de la hebra antisentido del dúplex con la diana, produciendo así la degradación enzimática de la diana (Tijsterman et al., (2002) *Science*, 295, 694-697).

En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) (por ejemplo, número de acceso NM_170735), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

Según aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) solo, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

En otro aspecto preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos de BDNF, por ejemplo, polinucleótidos expuestos como SEQ ID NO: 2, y cualquier variante, alelo, homólogo, mutante, derivado, fragmento y secuencia complementaria a los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como SEQ ID NOS: 3 a 8.

En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de

antisentido del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), que incluyen sin limitación secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas a polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y modulan la expresión y/o función de moléculas del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

5 En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son complementarios a o se unen a secuencias de ácidos nucleicos de antisentido natural de BDNF, expuestas como SEQ ID NO: 2 y modulan la expresión y/o función de moléculas de BDNF.

En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de
10 SEQ ID NOS: 3 a 8 y modulan la expresión y/o función de moléculas del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

Las dianas de polinucleótido comprenden BDNF, que incluye miembros de su familia, variantes de BDNF; mutantes de BDNF, que incluyen SNP; secuencias no codificantes de BDNF; alelos de BDNF; variantes de especies,
15 fragmentos y similares. Preferentemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

En otro aspecto preferido, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (iARN), ARN interferente pequeño (siRNA); microARN interferente (miARN); un ARN temporal pequeño (ARNtp); o un ARN de horquilla corta (ARNhc);
20 activación génica inducida por ARN pequeño (aARN); o, ARN activante pequeño (ARNap).

En otro aspecto preferido, el direccionamiento de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), por ejemplo, SEQ ID NO: 2, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada por incremento en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o
25 función se regula por disminución en comparación con un control.

En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como SEQ ID NOS: 3 a 8. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

30 En otro aspecto preferido, las SEQ ID NOS: 3 a 8 comprenden uno o más nucleótidos de LNA.

La Tabla 1 muestra a modo de ejemplo oligonucleótidos antisentido útiles en los métodos de la divulgación.

35

Tabla 1

ID de secuencia	Nombre del oligo	Secuencia
SEQ ID NO:3	CUR-0076	C*+T*+T*G*A*A*T*T*G*T*T*+G*+T*+A
SEQ ID NO:4	CUR-0075	A*+G*+T*T*G*C*A*A*G*A*G*T*+T*+G*+G
SEQ ID NO:5	CUR-0074	A*+T*+C*T*G*T*T*C*T*G*C*T*+G*+T*+C
SEQ ID NO:6	CUR-0071	C*+A*+T*A*T*T*C*T*T*G*G*A*+C*+G*+A
SEQ ID NO:7	CUR-0072	T*+G*+T*G*C*T*G*T*T*G*T*A*+A*+G*+A
SEQ ID NO:8	CUR-0073	T*+G*+A*C*A*G*A*G*G*A*G*T*+A*+T*+T

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, siRNA, etc. Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos (por ejemplo, ribozimas) son moléculas de ácidos nucleicos capaces de catalizar una o más de una variedad de reacciones, que
40 incluyen la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo específico de secuencia de bases de nucleótidos. Tales moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden usarse, por ejemplo, para dirigirse prácticamente a cualquier transcrito de ARN (Zaug et al., 324, Nature 429 1986; Cech, 260 JAMA 3030, 1988; y Jefferies et al., 17 Nucleic Acids Research 1371, 1989).

45 Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos que se escinden en trans muestran promesa como agentes terapéuticos para enfermedad humana (Usman & McSwiggen, (1995) Ann. Rep. Med. Chem. 30, 285-294; Christoffersen and Marr, (1995) J. Med. Chem. 38, 2023-2037). Las moléculas de ácidos nucleicos enzimáticos pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión tal convierte el ARNm en no funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN.
50 De este modo puede inhibirse selectivamente la síntesis de una proteína asociada a un estado de enfermedad.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN

diana. Tal unión se produce mediante la porción de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático se reconoce primero y entonces se une a ARN diana mediante apareamiento de bases complementario, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión 5 estratégica de un ARN diana tal destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

Se han usado varios enfoques, tales como estrategias de selección *in vitro* (evolución) (Orgel, (1979) Proc. R. Soc. 10 London, B 205, 435), para desarrollar nuevos catalizadores de ácido nucleico capaces de catalizar una variedad de reacciones, tales como escisión y ligación de enlaces fosfodiéster y enlaces amida (Joyce, (1989) Gene, 82, 83-87; Beaudry et al., (1992) Science 257, 635-641; Joyce, (1992) Scientific American 267, 90-97; Breaker et al., (1994) TIBTECH 12, 268; Bartel et al., (1993) Science 261:1411- 1418; Szostak, (1993) TIBS 17, 89-93; Kumar et al., (1995) FASEB J., 9, 1183; Breaker, (1996) Curr. Op. Biotech., 7, 442).

15 El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (k_{cat}) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de concentraciones saturantes (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. Se ha mostrado que una ribozima de "ligasa 20 de ARN" artificial cataliza la reacción de auto-modificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min⁻¹. Además, se sabe que ciertas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen brazos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de recuperación que se aproximan a 100 min⁻¹. Finalmente, la sustitución de un residuo específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con ciertos análogos de nucleótido da ribozimas modificadas que muestran una mejora de nada menos 10 veces en 25 la velocidad catalítica. Estos hallazgos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas que se auto-escinden naturales. Entonces es posible que las estructuras de ciertas ribozimas que se auto-escinden puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de 30 ARN.

La escisión intermolecular de un sustrato de ARN por un catalizador de ARN que se ajusta al modelo de "cabeza de martillo" se mostró por primera vez en 1987 (Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600). Se recuperó el catalizador de ARN y se hizo reaccionar con múltiples moléculas de ARN, demostrando que era verdaderamente 35 catalítico.

Se han usado ARN catalíticos diseñados basados en el motivo de "cabeza de martillo" para escindir secuencias diana específicas haciendo cambios de base apropiados en el ARN catalítico para mantener apareamiento de bases necesarios con las secuencias diana (Haseloff y Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot y Bruening, (1988) 40 Nature, 334, 196; Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600; Koizumi, M., et al. (1988) FEBS Lett., 228: 228-230). Esto ha permitido el uso del ARN catalítico para escindir secuencias diana específicas e indica que los ARN catalíticos diseñados según el modelo de "cabeza de martillo" pueden escindir posiblemente ARN de sustrato específico *in vivo* (véase Haseloff y Gerlach, (1988) Nature, 334, 585; Walbot y Bruening, (1988) Nature, 334, 196; Uhlenbeck, O. C. (1987) Nature, 328: 596-600).

45 La interferencia de ARN (iARN) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamífero. Este enfoque requiere la administración de ARN interferente pequeño (siRNA) bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para ARN de horquilla pequeño que se procesa a siRNA. Este sistema permite el eficaz transporte de los pre-siRNA al 50 citoplasma en el que son activos y permite el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.

En un aspecto preferido, un oligonucleótido o compuesto antisentido comprende un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) y/o ácido desoxirribonucleico (ADN), o un mimético, quimera, análogo u homólogo de los 55 mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleótidos que existen de forma natural, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (esqueleto), además de oligonucleótidos que tienen porciones que no existen de forma natural que funcionan similarmente. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son frecuentemente deseados con respecto a formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, afinidad potenciada por un ácido nucleico diana y elevada estabilidad en presencia de nucleasas.

Según la presente divulgación, los oligonucleótidos o “compuestos antisentido” incluyen oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, ARN, ADN, mimético, quimera, análogo u homólogo de los mismos), ribozimas, oligonucleótidos de secuencia de guía externa (EGS), compuestos de siRNA, compuestos de interferencia (iARN) de ARN mono- o bicatenario tales como compuestos de siRNA, ARN_{ap}, ARN_a, y otros compuestos oligoméricos que hibridan con al menos una porción del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan rutinariamente linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro modo para ser circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir construcciones tales como, por ejemplo, dos hebras hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única hebra con auto-complementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos hebras pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Alternativamente, las dos hebras pueden enlazarse mediante un resto no de ácido nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una hebra, el dsARN puede tomar la forma de una molécula tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Así, el dsARN puede ser completa o parcialmente bicatenario. Puede lograrse modulación específica de la expresión génica por expresión estable de horquillas de dsARN en líneas celulares transgénicas (Hammond et al., (1991) *Nat. Rev. Genet.*, 2, 110-119; Matzke et al., (2001) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11, 221-227; Sharp, (2001) *Genes Dev.*, 15, 485-490). Cuando se forma a partir de dos hebras, o una única hebra que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla auto-complementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos hebras (o regiones formadoras de dúplex de una sola hebra) son hebras de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

Una vez introducido a un sistema, los compuestos de la divulgación pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la escisión u otra modificación del ácido nucleico diana o pueden trabajar mediante mecanismos basados en la ocupación. En general, los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos) pueden describirse como “similares a ADN” (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-desoxiazúcares y, generalmente, bases T en vez de U) o “similares a ARN” (es decir, que generalmente tienen uno o más 2'-hidroxilazúcares o azúcares modificados en 2' y, generalmente bases U en vez de T). Las hélices de ácido nucleico pueden adoptar más de un tipo de estructura, más comúnmente las formas A y B. Se cree que, en general, los oligonucleótidos que tienen estructura similar a la forma B son “similares a ADN” y aquellos que tienen estructura similar a la forma A son “similares a ARN”. En algunos casos (quiméricos), un compuesto antisentido puede contener tanto regiones en forma A como B.

Los compuestos antisentido según la presente divulgación pueden comprender una porción antisentido de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos (es decir, de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleósidos enlazados) de longitud. Esto se refiere a la longitud de la hebra antisentido o porción del compuesto antisentido. En otras palabras, un compuesto antisentido monocatenario de la divulgación comprende de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos, y un compuesto antisentido bicatenario de la divulgación (tal como un dsARN, por ejemplo) comprende una hebra sentido y antisentido o porción de 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éste comprenda porciones antisentido de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, u 80 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

En un aspecto, los compuestos antisentido de la divulgación tienen porciones antisentido de 10 a 50 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éstos integran oligonucleótidos que tienen porciones antisentido de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias. En algunos aspectos, los oligonucleótidos tienen 15 nucleótidos de longitud.

En un aspecto, los compuestos antisentido o de oligonucleótido de la divulgación tienen porciones antisentido de 12 o 13 a 30 nucleótidos de longitud. Un experto habitual en la materia apreciará que éstos integran compuestos

antisentido que tienen porciones antisentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, o cualquier intervalo entremedias.

En otro aspecto preferido, los compuestos oligoméricos de la presente divulgación también incluyen variantes en las que una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótido en el compuesto. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esa posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones de los compuestos antisentido o de dsARN. Estos compuestos se prueban entonces usando los métodos descritos en el presente documento para determinar su capacidad para inhibir la expresión de un ácido nucleico diana.

En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y diana, es de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 60 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 70 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %. En algunos aspectos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o aproximadamente el 100 %.

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido, tales como, por ejemplo, las moléculas de ácidos nucleicos expuestas en SEQ ID NOS: 2 a 8, comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácidos nucleicos sentido y/o antisentido de secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas a BDNF y las secuencias expuestas como SEQ ID NOS: 1, 2. Los oligonucleótidos también se dirigen a regiones solapantes de SEQ ID NOS: 1, 2.

Ciertos oligonucleótidos preferidos de la presente divulgación son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente divulgación, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida de al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, elevada resistencia a nucleasas, elevada captación en células, elevada afinidad de unión por la diana) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de RNasa H, por tanto, produce la escisión del ARN diana, potenciando así enormemente la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica. En un aspecto preferido, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana, y, normalmente, una región que actúa de sustrato para RNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la T_m de un par de oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y la diana; la disociación se detecta espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea la T_m , mayor será la afinidad del oligonucleótido por la diana.

Los compuestos antisentido quiméricos de la divulgación pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o de oligonucleótidos, como se han descrito anteriormente. Tales compuestos también se han denominado en la materia híbridos o gámperos. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. Nº 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

En otro aspecto preferido, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, más preferentemente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquilo-O-alquilo o 2'-flúor. En otros aspectos preferidos, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-flúor, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, residuos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Tales modificaciones se incorporan rutinariamente en oligonucleótidos y se ha mostrado que estos oligonucleótidos

tienen una mayor T_m (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxi-oligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de tal afinidad elevada es potenciar enormemente la inhibición por oligonucleótidos de iARN de la expresión génica. La RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN del dúplex de ARN:ADN; por tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y así puede enormemente potenciar la eficiencia de inhibición de iARN. La escisión del ARN diana puede demostrarse rutinariamente por electroforesis en gel. En otro aspecto preferido, el oligonucleótido quimérico también se modifica para potenciar la resistencia a nucleasas. Las células contienen una variedad de exo- y endo-nucleasas que puede degradar ácidos nucleicos. Se ha mostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido en el que se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide rutinariamente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o disoluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, normalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para potenciar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que una variedad de modificaciones de oligonucleótidos potencia o confiere resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos aspectos, las modificaciones de oligonucleótidos que potencian la afinidad de unión a diana son, por tanto, independientemente capaces de potenciar la resistencia a nucleasas. Algunas modificaciones deseables pueden encontrarse en De Mesmaeker et al. (1995) *Acc. Chem. Res.*, 28:366-374.

Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por la presente divulgación incluyen aquellos que comprenden esqueletos modificados, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, particularmente esqueletos de $\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2$ [conocido como un esqueleto de metil(metilimino) o MMI], $\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2$, $\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2$ y $\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2$, en los que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa O-P-O-CH_2 . También se prefieren esqueletos de amida descritos por De Mesmaeker et al. (1995) *Acc. Chem. Res.* 28:366-374. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino (Summerton y Weller, patente de EE.UU. Nº 5.034.506). En otros aspectos preferidos, tales como el esqueleto de ácido nucleico peptídico (PNA), el esqueleto de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por un esqueleto de poliamida, estando los nucleótidos unidos directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno azo del esqueleto de poliamida (Nielsen et al. (1991) *Science* 254, 1497). Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nNH₂ o O(CH₂)_nCH₃ en los que n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo C1 a C10 inferior, alcoxialcoxi, alquilo, alcarilo o aralquilo inferior sustituido; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo indicador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo)] (Martin et al., (1995) *Helv. Chim. Acta.* 78, 486). Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir, adicionalmente o alternativamente, modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la materia simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, por ejemplo, hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la materia 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, por ejemplo, 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N6(6-aminohexil)adenina y 2,6-diaminopurina (Kornberg, A., *DNA Replication*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pp. 75-77; Gebeyehu, G., (1987) et al. *Nucl. Acids Res.* 15:4513). Puede incluirse una base "universal" conocida en la técnica, por ejemplo, inosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-Me-C aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. and Lebleu, B.,

eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son las sustituciones de base actualmente preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad o captación celular del oligonucleótido. Tales restos incluyen, pero no se limitan a, restos de lípido tales como un resto de colesterol, un resto colesterilo (Letsinger et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 6553), ácido cólico (Manoharan et al. (1994) Bioorg. Med. Chem. Let. 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660, 306; Manoharan et al. (1993) Bioorg. Med. Chem. Let. 3, 2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res. 20, 533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo (Saison-Behmoaras et al. EMBO J. 1991, 10, 111; Kabanov et al. (1990) FEBS Lett. 259, 327; Svinarchuk et al. (1993) Biochimie 75, 49), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 3651; Shea et al. (1990) Nucl. Acids Res. 18, 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al. (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14, 969), o ácido adamantanoacético (Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett. 36, 3651). Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y métodos para preparar tales oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.138.045, 5.218.105 y 5.459.255.

No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado estén uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse en un único oligonucleótido o incluso dentro de un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente divulgación también incluye oligonucleótidos que son oligonucleótidos quiméricos como se define anteriormente en este documento.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación está conjugada con otro resto que incluye, pero no se limita a, nucleótidos abásicos, poliéter, poliamina, poliamidas, péptidos, hidratos de carbono, lípido, o compuestos de polihidrocarburo. Aquellos expertos en la materia reconocerán que estas moléculas pueden enlazarse a uno o más de cualquiera de los nucleótidos que comprenden la molécula de ácido nucleico en varias posiciones en el azúcar, base o grupo fosfato.

Los oligonucleótidos usados según la presente divulgación pueden prepararse convenientemente y rutinariamente mediante la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. Equipo para tales síntesis se vende por varios vendedores que incluyen Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para tal síntesis; la síntesis actual de los oligonucleótidos está perfectamente dentro de las aptitudes de un experto habitual en la materia. También es muy conocido usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados. También es muy conocido usar técnicas similares y amiditos modificados comercialmente disponibles y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible de Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos fluorescentemente marcados, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

Según la divulgación, el uso de modificaciones tales como el uso de monómeros de LNA para potenciar la potencia, especificidad y duración de la acción y ampliar las vías de administración de oligonucleótidos comprende químicas actuales tales como MOE, ANA, FANA, PS, etc. (Uhlman, et al. (2000) Current Opinions in Drug Discovery & Development Vol. 3 No 2). Esto puede lograrse sustituyendo algunos de los monómeros en los presentes oligonucleótidos por monómeros de LNA. El oligonucleótido modificado con LNA puede tener un tamaño similar al compuesto parental o puede ser más largo o preferentemente más pequeño. Se prefiere que tales oligonucleótidos modificados con LNA contengan menos de aproximadamente el 70 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 60 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 50 % de monómeros de LNA y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos comprenden, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que comprenden 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que comprenden 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados en 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están enlazados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Esqueletos de oligonucleótido modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en ellos tienen esqueletos que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenoformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un oligonucleótido mimético que se ha mostrado que tiene excelente propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno azo de la porción de amida del esqueleto. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Enseñanzas adicionales de compuestos de PNA pueden encontrarse en Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-1500.

En otro aspecto preferido de la divulgación, los oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-, son conocidos como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- en las que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de EE.UU. N° 5.489.677 anteriormente citada, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. N° 5.602.240 anteriormente citada. También se prefieren oligonucleótidos que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de EE.UU. N° 5.034.506 anteriormente citada.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C a CO sustituido o sin sustituir o alqueno y alquino C₂ a CO. Particularmente se prefieren O(CH₂)_nOmCH₃, O(CH₂)_n, OCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂nON(CH₂)_nCH₃)₂ en las que n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2'-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., (1995) Helv. Chim. Acta, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-flúor (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente

la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del pentofuranosil azúcar. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. 5 N° 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; y 5.700.920.

Los oligonucleótidos también pueden comprender modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la materia simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleótidos "no 10 modificados" o "naturales" comprenden las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados comprenden otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, derivados de 2-propilo y otros de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azouracilo, 15 citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

20 Además, los nucleótidos comprenden los descritos en la patente de Estados Unidos N° 3.687.808, los descritos en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos descritos por Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, page 613, y aquellos descritos por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Croke, S.T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Ciertos de estos nucleótidos son particularmente útiles para 25 aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y.S., Croke, S.T. and Lebleu, B., eds, 'Antisense Research and Applications', CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son sustituciones de base actualmente preferidas, 30 incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietilazúcar.

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los nucleótidos modificados anteriormente indicados, además de otros nucleótidos modificados, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 3.687.808, además de 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 35 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.596.091; 5.614.617; 5.750.692 y 5.681.941.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados, que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido.

40 Tales restos comprenden, pero no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol (Letsinger et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., (1994) Bioorg. Med. Chem. Let., 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci., 660, 306-309; Manoharan et al., (1993) Bioorg. Med. Chem. Let., 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) Nucl. Acids Res., 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o de undecilo (Kabanov et al., 45 (1990) FEBS Lett., 259, 327-330; Svinarchuk et al., (1993) Biochimie 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett., 36, 3651-3654; Shea et al., (1990) Nucl. Acids Res., 18, 3777-3783) una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Mancharan et al., (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14, 969-973), o ácido adamantanoacético (Manoharan et al., (1995) Tetrahedron Lett., 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al., (1995) Biochim. 50 Biophys. Acta, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Croke et al., (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., 277, 923-937).

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales oligonucleótidos conjugados comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 55 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371;

5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Descubrimiento de fármacos: Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en los esfuerzos del descubrimiento de fármacos para esclarecer relaciones que existen entre polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y un estado de enfermedad, fenotipo o afección. Estos métodos incluyen detectar o modular los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con otro compuesto de la divulgación. Estos métodos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el proceso de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

Evaluación de la regulación por incremento o inhibición de la expresión génica:

La transferencia de un ácido nucleico exógeno en una célula huésped u organismo puede evaluarse detectando directamente la presencia del ácido nucleico en la célula u organismo. Tal detección puede lograrse por varios métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la presencia del ácido nucleico exógeno puede detectarse por Southern blot o por una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores que amplifican específicamente secuencias de nucleótidos asociadas al ácido nucleico. La expresión de los ácidos nucleicos exógenos también puede medirse usando métodos convencionales que incluyen análisis de expresión génica. Por ejemplo, el ARNm producido a partir de un ácido nucleico exógeno puede detectarse y cuantificarse usando una Northern blot y PCR con transcripción inversa (RT-PCR).

La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en conservación de secuencias, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región codificante entre una región codificante reportera y su señal de poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen reportero en la porción upstream del gen y una posible diana de iARN en la región no codificante 3'. La eficacia de oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen reportero. Genes reporteros útiles en los métodos de la presente divulgación incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta-glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los métodos de determinación de la modulación de un gen reportero son muy conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, métodos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de la proteína BDNF y de ARNm puede ensayarse usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia y descritos en cualquier parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales como ELISA para medir niveles de proteína. Los kit de ELISA de BDNF están comercialmente disponibles, por ejemplo, de R&D Systems (Mineápolis, MN).

En aspectos, la expresión de BDNF (por ejemplo, ARNm o proteína) en una muestra (por ejemplo, células o tejidos *in vivo* o *in vitro*) tratada usando un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúa comparando con la expresión de BDNF en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o ácido nucleico puede compararse usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia con aquella en una muestra tratada con vector vacío o sin tratar. Alternativamente, la comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de control (por ejemplo, una que tiene una secuencia alterada o diferente) puede hacerse dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína o ácido nucleico BDNF en

una muestra tratada frente a sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier estándar considerado apropiado por el investigador, por ejemplo, un gen de mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

5 Las diferencias observadas pueden expresarse según se desee, por ejemplo, en forma de una relación o fracción, para su uso en una comparación con control. En aspectos, el nivel de ARNm de BDNF o proteína, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, disminuye o aumenta aproximadamente 1,25 veces a aproximadamente 10 veces o más con respecto a una muestra sin tratar o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En aspectos, el nivel de ARNm de BDNF o proteína aumenta o disminuye al menos
 10 aproximadamente 1,25 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al
 15 menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.

20 *Kits, reactivos de investigación, diagnósticos y terapéuticos*

Los compuestos de la presente divulgación pueden utilizarse para diagnóstico, agentes terapéuticos y profilaxis, y como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, se usan frecuentemente por aquellos expertos para aclarar
 25 la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una vía biológica.

Para su uso en kits y diagnósticos y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente divulgación, tanto solo como en combinación con otros compuestos o terapéuticos, son útiles como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para aclarar patrones de expresión de una porción o del complemento entero de
 30 genes expresados dentro de células y tejidos.

Como se usa en el presente documento, el término "sistema biológico" o "sistema" se define como cualquier organismo, célula, cultivo celular o tejido que expresa, o se ha hecho competente para expresar productos de genes del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Éstos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales
 35 transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

Como un ejemplo no limitante, patrones de expresión dentro de células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido se comparan con células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y los patrones producidos se analizan para niveles diferenciales de expresión génica ya que están relacionados, por ejemplo, con
 40 asociación de enfermedad, vía de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Estos análisis pueden realizarse en células estimuladas o sin estimular y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan los patrones de expresión.

Ejemplos de métodos de análisis de la expresión génica conocidos en la técnica incluyen matrices o micromatrices de ADN (Brazma and Vilo, (2000) FEBS Lett., 480, 17-24; Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16), SAGE (análisis en serie de la expresión génica) (Madden, et al., (2000) Drug Discov. Today, 5, 415- 425), READS (amplificación por enzima de restricción de ADN digeridos) (Prashar and Weissman, (1999) Methods Enzymol., 303, 258-72), TOGA (análisis de la expresión génica total) (Sutcliffe, et al., (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 97, 1976-81), matrices de proteínas y proteómica (Celis, et al., (2000) FEBS Lett., 480, 2-16; Jungblut, et al., Electrophoresis, 1999, 20, 2100-
 50 10), secuenciación de marcadores de secuencia expresada (EST) (Celis, et al., FEBS Lett., 2000, 480, 2-16; Larsson, et al., J. Biotechnol., 2000, 80, 143-57), huellas genómicas de ARN sustractivas (SuRF) (Fuchs, et al., (2000) Anal. Biochem. 286, 91-98; Larson, et al., (2000) Cytometry 41, 203-208), clonación sustractiva, expresión diferencial (DD) (Jurecic and Belmont, (2000) Curr. Opin. Microbiol. 3, 316-21), hibridación genómica comparativa (Carulli, et al., (1998) J. Cell Biochem. Suppl., 31, 286-96), técnicas de FISH (hibridación *in situ* fluorescente) (Going and Gusterson, (1999) Eur. J. Cancer, 35, 1895-904) y métodos de espectrometría de masas (To, Comb. (2000) Chem. High Throughput Screen, 3, 235-41).

Los compuestos de la divulgación son útiles para investigación y diagnóstico, debido a que estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Por ejemplo, los

oligonucleótidos que hibridan con tal eficiencia y bajo tales condiciones que se han descrito en el presente documento por ser eficaces. Los moduladores del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en métodos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, particularmente los cebadores y sondas, de la divulgación con un ácido nucleico que codifica factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Tales medios pueden incluir conjugación de una enzima con el oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido, o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan tales medios de detección para detectar el nivel del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en una muestra.

La especificidad y sensibilidad de antisentido también se emplea por aquellos expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de estados de enfermedad en animales, que incluyen seres humanos. Los fármacos de oligonucleótido antisentido se han administrado con seguridad y eficazmente a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. Así, se establece que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en pautas de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para terapéuticos, un animal, preferentemente un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión del polinucleótidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) se trata administrando compuestos antisentido según la presente divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los métodos comprenden la etapa de administrar al animal en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del modulador del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Los moduladores del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) de la presente divulgación modulan eficazmente la actividad del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) o modulan la expresión de la proteína del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). En un aspecto, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se inhibe aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se inhibe aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se inhibe el 50 % o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y/o en un animal se eleva aproximadamente el 10 % en comparación con un control. Preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se eleva aproximadamente el 30 %. Más preferentemente, la actividad o expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en un animal se eleva el 50 % o más. Así, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) al menos el 10 %, al menos el 50 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) puede medirse en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro líquido corporal, tejido u órgano del animal. Preferentemente, las células contenidas dentro de dichos líquidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y/o la propia proteína del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

Los compuestos de la divulgación pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. El uso de los compuestos y métodos de la divulgación también pueden ser útiles profilácticamente.

Conjugados

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más

restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, potencian la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente divulgación, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o eliminación de los compuestos de la presente divulgación. Grupos conjugados representativos se desvelan en la solicitud de patente internacional N° PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la patente de EE.UU. N° 6.287.860. Restos conjugados incluyen, pero no se limitan a, restos de lípido tales como un resto colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-5-tritilitol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantanoacético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico ácido, folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales oligonucleótidos conjugados incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

Formulaciones

Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales formulaciones que ayudan en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N° 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.165; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan administrarse en el contexto de un vector con el fin de modular una expresión y/o función de diana, aspectos de la divulgación se refieren a construcciones de vector de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprende promotores, secuencias de genes promotores híbridos y poseen una fuerte actividad constitutiva promotora, o una actividad de promotor que puede inducirse en el caso deseado.

En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de administración de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral operativamente ligado al polinucleótido. Ejemplos de tales vectores no virales incluyen el oligonucleótido solo (por ejemplo, una cualquiera o más de SEQ ID NOS: 3 a 8) o en combinación con una formulación de proteína, polisacárido o lípido adecuada.

Sistemas de administración de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen vector viral, normalmente secuencia de al menos uno de un adenovirus, virus asociado a adenovirus (AAV), adenovirus dependiente de cooperador, retrovirus, o complejo de virus hemaglutinante de Japón-liposoma (HVJ). Preferentemente, el vector viral comprende un promotor de eucariota fuerte operativamente enlazado al polinucleótido, por ejemplo, un promotor del

citomegalovirus (CMV).

5 Vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el VIH. Un vector viral basado en el VIH preferido comprende al menos dos vectores en los que los genes gag y pol son de un genoma del VIH y el gen env es de otro virus. Se prefieren vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV) [Geller, A.I. et al., (1995) J. Neurochem, 64: 487; Lim, F., et al., en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I. et al., (1993) Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A.:90 7603; 10 Geller, A.I., et al., (1990) Proc Natl. Acad. Sci USA: 87:1149], vectores de adenovirus (LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., (1993) Nat. Genet. 3: 219; Yang, et al., (1995) J. Virol. 69: 2004) y vectores de virus adeno-asociados (Kapliitt, M.G., et al., (1994) Nat. Genet. 8:148).

15 Los compuestos antisentido de la divulgación engloban cualquier sal farmacéuticamente aceptable, éster o sal de tales ésteres, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.

20 El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológicamente y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860.

25 La presente divulgación también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos antisentido de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse en varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intrarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por 30 ejemplo, intratecal o intraventricular.

35 Para tratar tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede hacerse por, por ejemplo, inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en líquido cefalorraquídeo se describe, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N°. 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

40 Si se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido objeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede hacerse, por ejemplo, en la corteza entorrinal o hipocampo. La administración de factores neurotróficos por administración de un vector de adenovirus a neuronas motoras en tejido muscular describe es, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.632.427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". La administración de vectores directamente al cerebro, por ejemplo, el estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra, se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6.756.523, "Adenovirus vectors for the transfer of 45 foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como mediante inyección o hacerse durante un periodo de tiempo como por infusión o administración lenta de formulaciones de liberación lenta.

50 Los oligonucleótidos antisentido objeto también puede enlazarse o conjugarse con agentes que proporcionan propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica para promover la penetración o transporte a través de la barrera hematoencefálica, tal como un anticuerpo para el receptor de transferrina, y administrarse mediante inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede enlazarse con un vector viral, por ejemplo, que hace al compuesto antisentido más eficaz y/o aumenta el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera 55 hematoencefálica. La rotura osmótica de la barrera hematoencefálica también puede llevarse a cabo por, por ejemplo, infusión de azúcares que incluyen, pero no se limitan a, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitól, L(-) arabitól, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa, o aminoácidos que incluyen, pero no se limitan a, glutamina,

lisina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina y taurina. Métodos y materiales para potenciar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 4.866.042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier", 6.294.520, "Material for passage through the blood-brain barrier", y 6.936.589, "Parenteral delivery systems".

Los compuestos antisentido objeto pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la captación de oligonucleótidos. Se mostró que una composición tal que facilitaba la captación es LIPOFECTIN (disponible de GIBCO-BRL, Bethesda, MD).

Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración por vía oral. Composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si fuera necesario, moldeando el producto.

Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente divulgación también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

Composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones de la presente divulgación pueden comprender uno o más potenciadores de la penetración, vehículos, excipientes u otros principios activos o inactivos.

Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una disolución en o bien la fase acuosa, fase aceitosa o bien él mismo como una fase separada. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860.

Formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a administrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas positivamente cargados que se cree que interaccionan con moléculas de ADN negativamente cargadas para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atapan el ADN en vez de complejarse con él. Se han usado tanto liposomas catiónicos como no catiónicos para administrar ADN a células.

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas en duración mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la porción de lípido formado de vesícula del liposoma comprende uno

o más glicolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860.

Las formulaciones farmacéuticas y composiciones de la presente divulgación también pueden incluir tensioactivos.

- 5 El uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones es muy conocido en la técnica. Tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860.

En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar la eficaz administración de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como que pertenecen a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860.

- 10
15 Un experto en la materia reconocerá que las formulaciones se diseñan rutinariamente según su uso previsto, es decir, vía de administración.

Formulaciones preferidas para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo, dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

- 20
25 Para administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la divulgación pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden estar complejados con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los oligonucleótidos de la divulgación se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Ácidos biliares/sales y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860. También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden administrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. N° 6.287.860.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no se limitan a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Ciertos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o varios de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorubicina, daunomicina, dactinomomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea,

desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usa con los compuestos de la divulgación, tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido),
 5 secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o varios de otros de tales agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Fármacos antiinflamatorios, que incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero no se limitan a, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la
 10 divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de la presente divulgación. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos
 15 antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), y la segunda diana puede ser una región de otro secuencia de nucleótidos. Alternativamente, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF). Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en el presente
 20 documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

Dosificación:

25 Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la experiencia de aquellos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y sensibilidad del estado de enfermedad que va a tratarse, durando el ciclo de tratamiento de varios días a varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución del estado de enfermedad. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden
 30 determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se encuentra que son eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos
 35 habituales en la materia pueden estimar fácilmente tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente reciba terapia de mantenimiento para prevenir la reaparición del estado de enfermedad, en el que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que oscilan de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años. En aspectos, un paciente se trata con
 40 una dosificación de fármaco que es al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos
 45 aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, o al menos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosificaciones inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 7.563.884, "Antisense modulation of PTP1B expression".

50 Aunque diversos aspectos de la presente divulgación se han descrito anteriormente, debe entenderse que se han presentado a modo de ejemplo solo, y no limitación. Pueden hacerse numerosos cambios a los aspectos descritos según la divulgación en el presente documento sin apartarse del espíritu o alcance de la divulgación. Así, la anchura y alcance de la presente divulgación no debe limitarse por cualquiera de los aspectos anteriormente descritos.

55 Por su citación de diversas referencias en este documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea "estado de la técnica" a su invención. Realizaciones de composiciones y métodos inventivos se ilustran en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no limitantes sirven para ilustrar realizaciones seleccionados de la invención. Se apreciará que variaciones en proporciones y alternativas en elementos de los componentes mostrados serán evidentes para aquellos expertos en la materia y están dentro del alcance de aspectos de la presente divulgación.

5

Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido para un polinucleótido del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y/o una hebra codificante de polinucleótido del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF)

10 Como se indica anteriormente el término “oligonucleótido específico para” u “dianas de oligonucleótido” se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una porción del gen elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una porción de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana.

15 La selección de oligonucleótidos apropiados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácidos nucleicos e indican regiones de identidad u homología. Tales programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad apropiado entre especies. En el caso de genes que no se han secuenciado, se realizan Southern blots para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Realizando Southern blots a grados de rigurosidad variables, como es muy conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que presentan un alto grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos diana en un sujeto que va a controlarse y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay libertad considerable en la selección de regiones apropiadas de genes para su uso en la presente invención.

20 Un compuesto antisentido es “específicamente hibridable” cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para producir una modulación de la función y/o actividad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias de ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que la unión específica se desea, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en condiciones en las que los ensayos se realizan en el caso de ensayos *in vitro*.

35

Las propiedades de hibridación de los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden determinarse por uno o más ensayos *in vitro* como se conoce en la técnica. Por ejemplo, las propiedades de los oligonucleótidos descritos en el presente documento pueden obtenerse por determinación de la intensidad de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco usando el ensayo de la curva de fusión.

40

La intensidad de unión entre el antisentido natural diana y una posible molécula de fármaco (molécula) puede estimarse usando cualquiera de los métodos establecidos de medición de la intensidad de interacciones intermoleculares, por ejemplo, un ensayo de la curva de fusión.

45 El ensayo de la curva de fusión determina la temperatura a la que se produce una rápida transición de conformación bicatenaria a monocatenaria para el complejo de antisentido natural/molécula. Esta temperatura es ampliamente aceptada como una medida fiable de la intensidad de interacción entre las dos moléculas.

50 Puede realizarse un ensayo de la curva de fusión usando una copia de ADNc de la molécula de ARN antisentido natural real o un nucleótido de ADN o ARN sintético correspondiente al sitio de unión de la molécula. Están disponibles múltiples kits que contienen todos los reactivos necesarios para realizar este ensayo (por ejemplo, kit MeltDoctor de Applied Biosystems Inc.). Estos kits incluyen una disolución de tampón adecuada que contiene uno de los colorantes de unión a ADN bicatenario (dsADN) (tales como los colorantes ABI HRM, SYBR Green, SYTO, etc.). Las propiedades de los colorantes de dsADN son tales que casi no emiten fluorescencia en forma libre, pero son altamente fluorescentes cuando se unen a dsADN.

55

Para realizar el ensayo, el ADNc o un oligonucleótido correspondiente se mezclan con la molécula en concentraciones definidas por los protocolos del fabricante particulares. La mezcla se calienta a 95 °C para disociar todos los complejos de dsADN previamente formados, luego se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra

temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se hibriden las moléculas de ADN. Entonces, los complejos recientemente formados se calientan lentamente a 95 °C con recogida de datos continua simultánea sobre la cantidad de fluorescencia que se produce por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de dsADN presentes en la reacción. Los datos pueden recogerse usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (por ejemplo, sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, RU).

Los picos de fusión se construyen representando la derivada negativa de la fluorescencia con respecto a la temperatura $(-d(\text{Fluorescencia})/dT)$ sobre el eje y) contra la temperatura (eje x) usando software apropiado (por ejemplo, LightTyper (Roche) o SDS Dissociation Curve, ABI). Los datos se analizan para identificar la temperatura de la rápida transición del complejo de dsADN a moléculas monocatenarias. Esta temperatura se llama T_m y es directamente proporcional a la intensidad de la interacción entre las dos moléculas. Normalmente, la T_m superará 40 °C.

15 Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos de BDNF

Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido:

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat nº HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone, cat nº SH30024 o Mediatech, cat nº MT-10-010-CV) + 10 % de FBS (Mediatech, cat nº MT35- 011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech, cat nº MT30-002-CI) a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de $1,5 \times 10^5/\text{ml}$ en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta disolución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat nº 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat nº 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la disolución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat nº Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat nº 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat nº AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat nº 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat nº 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

Se calcularon el cambio en veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido basándose en la diferencia en valores de dCt normalizados con 18S entre muestras tratadas y transfectadas con vector vacío.

45 Oligos de detección para BDNF antisentido:

ID de ensayo de ABI Hs00417345_m1
Secuencia contexto GCACACCTGGAGATACTCTATTATA (SEQ ID No.: 9)

50 Oligos de detección para BDNF:

ID de ensayo de ABI Hs00542425_s1
CCTGCAGAATGGCCTGGAATTACAA (SEQ ID No.: 10)

55 *Resultados:*

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de BDNF en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los gámperos de LNA con esqueleto completamente fosfotioatado diseñados para BDNF antisentido (CUR-71, P=0,04, CUR-73, P=0,07, CUR-76, P=0,03) (Fig. 1A). En

las mismas muestras, los niveles de BDNF antisentido disminuyeron significativamente después del tratamiento con todos los oligos, excepto CUR-72, que es posiblemente debido a que diferentes oligos afectan diferentes variantes de splicing de BDNF y/o BDNF antisentido (Fig. 1B).

5 Tratamiento de células CHP212 con oligonucleótidos antisentido:

Se cultivaron células CHP212 de ATCC (cat n° CRL-2273) en medio de crecimiento (MEM/F12 (ATCC, cat n° 30-2003 y Mediatech, cat n° 10-080-CV) + 10 % de FBS (Mediatech, cat n° MT35-011-CV) + penicilina/estreptomicina (Mediatech, cat n° MT30-002-CI)) a 37 °C y 5 % de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse a la densidad de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento nuevo. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta disolución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat n° 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat n° 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicó a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células CHP212. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la disolución de oligonucleótido para los controles transfectados con vector vacío. Después de 3-18 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂, el medio se cambió a medio de crecimiento nuevo. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y se extrajo ARN de las células usando el sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat n° Z3105) o el kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat n° 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se añadieron 600 ng de ARN a la reacción de transcripción inversa realizada usando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat n° AB1453B) o el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (cat n° 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat n° 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00542425_s1 por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

Se calcularon el cambio en veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido basándose en la diferencia en valores de dCt normalizados con 18S entre muestras tratadas y transfectadas con vector vacío.

Resultados:

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de BDNF en células CHP212 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con tres de los oligos diseñados para BDNF antisentido (Fig. 1C).

Ejemplo 3: Modulación antisentido de producto de polinucleótido y de proteína de BDNF y efecto sobre la memoria y el aprendizaje en ratones transgénicos para amiloide

Se administran oligonucleótidos antisentido específicos para BDNF-AS (por ejemplo, oligonucleótidos identificados por SEQ ID NOS 3-8) a ratones J20, que expresan el transgén de la proteína precursora de amiloide (APP) humana que lleva tanto las mutaciones de APP Swedish como Indiana. Como se describe por, por ejemplo, Nagahara, et al., 2009, "Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease", Nature Medicine 15(3): 331-337, estos ratones muestran placas corticales y pérdida de células progresiva en la corteza entorrinal que empieza a la edad de 2-3 meses, y declive cognitivo a los 6-7 meses. Se recogen muestras de sangre previas al tratamiento varios días antes de la dosificación recogiendo 4-7 gotas de la vena de la cola. Cada oligonucleótido antisentido se disuelve en PBS y se administra en un ratón mediante inyección en la corteza entorrinal o el hipocampo a aproximadamente 10 mg/kg. Los ratones de control (compañeros de camada WT de la misma edad) se administran con el mismo volumen de PBS solo. Un mes después, se prueba la memoria espacial en el laberinto de agua de Morris en ratones tratados y de control, y se compara su rendimiento. También se prueban los efectos reconstituyentes del aprendizaje midiendo el aprendizaje dependiente del hipocampo e independiente del hipocampo. Después de la prueba, los ratones se sacrifican y se recogen tejidos cerebrales (corteza entorrinal y giro dentado hipocámpico) para el análisis de expresión de proteína y ARNm de BDNF. La concentración de proteína BDNF humana y los niveles de secreción se determinan usando un kit de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) (disponible comercialmente, por ejemplo, Quantikine human BDNF, R&D Systems, Mineápolis, MN), según las instrucciones del fabricante. El ARNm se ensaya usando RT-PCR, como se describe en cualquier parte en el presente documento.

Ejemplo 4: Modulación antisentido de producto de polinucleótido y de proteína de BDNF y efecto sobre la memoria y el aprendizaje en ratones SAM-P8.

La cepa P8 de ratones de senescencia acelerada (SAM), como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6.310.048, "Antisense modulation of amyloid beta protein expression", muestra un aumento relacionado con la edad en los problemas del aprendizaje (adquisición) y memoria (retención), además de un aumento relacionado con la edad en la acumulación de proteína precursora de amiloide y A β P. Los ratones SAM-P8 tienen una mediana de la vida de 17,2 meses, a diferencia de una vida normal de 24 meses para ratones R1 estándar.

10 Se dividen ratones SAM-P8 en siete grupos de 10 ratones cada uno. A los 11 meses de edad (4 semanas antes del entrenamiento), un grupo se administra con 0,2 microlitros de suero de ternero por inyección ventricular intracerebral (ICV), mientras que los otros seis grupos se administran con una o dos inyecciones de 0,2 microlitros (cada una de 2 microlitros y que tiene 60 ng de oligonucleótido) ICV de oligonucleótidos antisentido de la presente divulgación. La administración se realiza taladrando un orificio a través del cráneo sobre el tercer ventrículo (-0,5 con respecto al bregma; 0,5 mm a la derecha de la sutura central). Se cierra el cuero cabelludo y los ratones se devuelven a sus jaulas. Dos semanas después de esta primera inyección, uno de los grupos de ratones tratados y el grupo que había recibido suero se inyectan con el vehículo de solución salina que se usa como vehículo para los oligonucleótidos antisentido. En este mismo tiempo (dos semanas antes del entrenamiento), cada uno de los oligonucleótidos se administra en solución salina ICV a todos los ratones en un grupo. Cada administración contiene 0,2 microlitros (60 ng de oligonucleótido por inyección).

Dos semanas después de la última inyección, cuando los ratones tienen 12 meses de edad, se entrenan para evitar choques en las patas en un laberinto en T. Los procedimientos de entrenamiento y de prueba son los mismos que se describen por Flood et al., *Physiology & Behavior*, 58:819-822 (1995); y Flood et al., *Neurobiology of Aging*, 14:159-166 (1993), y la patente de EE.UU. N° 6.310.048. Todos los ratones son entrenados hasta que hacen su primera respuesta de evitación. Se comparan las puntuaciones de la prueba de retención cuando se prueba 1 h después del entrenamiento y una semana después. Una semana después del entrenamiento original, la retención para tanto ratones de 4 como de 12 meses de edad se prueba continuando el entrenamiento hasta que cada ratón hace 5 evitaciones en 6 ensayos de entrenamiento consecutivos. Los resultados se expresan como medias y con un error estándar de las medias. Los ensayos hasta la primera evitación, o hasta un criterio de 5 evitaciones en 6 ensayos consecutivos, se analizan en ANOVA unilaterales separados. Las diferencias estadísticas entre las medias de los ratones de 12 meses de edad que recibieron oligonucleótidos antisentido se comparan con las medias de los ratones de 12 meses de edad que recibieron el vehículo de solución salina usando la prueba de la t de Dunnett.

35 Las muestras se recuperan de las regiones de la amígdala, hipocámpica y septal de los cerebros de cada uno de los cuatro ratones, dos tratados con el vehículo de solución salina y los otros dos tratados con los oligonucleótidos antisentido. Las muestras se prueban para la expresión de proteínas BDNF por ELISA o inmunotransferencia contra un anticuerpo que hibrida específicamente con BDNF.

40 Ejemplo 5: Modulación antisentido de producto de polinucleótido y de proteína de BDNF y efecto sobre progresión de la enfermedad en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica

Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación (por ejemplo, un oligonucleótido identificado por cualquiera de SEQ ID NOS: 3-8) se administra al líquido cefalorraquídeo de un individuo que padece ELA familiar. Se usa una bomba SyncroMed II de Medtronic para administrar la composición al líquido cefalorraquídeo. La bomba se implanta quirúrgicamente según las instrucciones del fabricante. El depósito de la bomba se carga con la composición farmacéutica en solución salina tamponada con fosfato. La composición farmacéutica se administra a una cantidad que da una infusión de 8 mg a 12 mg/día del oligonucleótido antisentido en el líquido cefalorraquídeo. El oligonucleótido antisentido se infunde, durante al menos 28 días. El fármaco se bombea a una dosis programada en un catéter que está quirúrgicamente intratecalmente implantado.

La progresión de la enfermedad se mide por métodos rutinarios en la materia y descritos en el presente documento, por ejemplo, usando indicadores que incluyen ALSFSR-R, y mediciones de FEV₁, FVC y fuerza muscular. Estos métodos son usados por un médico para evaluar el estado de enfermedad al inicio del tratamiento, y para proporcionar un nivel inicial para el estado de enfermedad. Las posteriores evaluaciones se realizan a intervalos, como se ha determinado por el médico, durante el periodo de administración. Se ensaya la expresión de proteína BDNF y ARNm en líquido cefalorraquídeo. La concentración de proteína BDNF humana y los niveles de secreción se determinan usando un kit de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) (por ejemplo, Quantikine human BDNF,

R&D Systems, Mineápolis, MN), según las instrucciones del fabricante. El ARNm se ensaya usando RT-PCR, como se describe en cualquier parte en el presente documento.

El resumen de la divulgación permitirá al lector determinar rápidamente la naturaleza de la divulgación técnica. Se presenta con el entendimiento de que no se usará para interpretar o limitar el alcance o significado de las siguientes reivindicaciones.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CuRNA, Inc.

5 <120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DE CEREBRO (BDNF) POR INHIBICIÓN DE TRANSCRITO ANTISENTIDO NATURAL PARA BDNF

<130> P37573EP-D1-PCT

10 <140> Aún no asignado

<141> 12/02/2010

<150> EP10741789.1

<151> 12/02/2010

15

<150> US 61/152.132

<151> 12/02/2009

<160> 11

20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4755

25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<300>

<308> Número de acceso NCBI NM_170735

30

<309> 18/07/2010

<313> (1)..(4755)

ES 2 762 610 T3

<400> 1
cacacacaca cacacacaca gagagaacat ctctagtaaa aagaaaagtt gagctttctt 60
agctagatgt gtgtattagc cagaaaaagc caaggagtga agggtttttag agaactggag 120
gagataaagt ggagtctgca tatgggaggc atttgaaatg gacttaaagt tctttttaat 180
gctgactttt tcagttttct ccttaccaga cacattgttt tcatgacatt agccccaggc 240
atagacacat cattaanaatg aacatgtcaa aaaatgattt ctgttttagaa ataagcaaaa 300
cattttcagt tgtgaccacc caggtgtaga ataaagaaca gtggaattgg gagccctgag 360
ttctaacata aactttcttc atgacataag gcaagtcttc tatggccttt ggtttcctta 420
cctgtaaaac aggatggctc aatgaaatta tctttcttct ttgctataat agagtatctc 480
tgtgggaaga ggaaaaaaaa agtcaattta aaggctcctt atagttcccc aactgctgtt 540
ttattgtgct attcatgect agacatcaca tagctagaaa ggcccatcag acccctcagg 600
ccactgctgt tctgtgcaca cattcctgca aaggaccatg ttgctaactt gaaaaaaaaatt 660
actattaatt acacttgcag ttgttgctta gtaacattta tgattttgtg tttctcgtga 720
cagcatgagc agagatcatt aaaaattaaa cttacaaagc tgctaaagtg ggaagaagga 780
gaacttgaag ccacaatttt tgcacttgcct tagaagccat ctaatctcag gttatatgct 840
agatcttggg ggcaaacact gcatgtctct ggtttatatt aaaccacata cagcacacta 900

ES 2 762 610 T3

ctgacactga tttgtgtctg gtgcagctgg agtttatcac caagacataa aaaaaccttg 960
 accctgcaga atggcctgga attacaatca gatgggccac atggcatccc ggtgaaagaa 1020
 agccctaacc agttttctgt cttgtttctg ctttctccct acagttccac caggtgagaa 1080
 gagtgatgac catccttttc cttactatgg ttatttcata ctttggttgc atgaaggctg 1140
 ccccatgaa agaagcaaac atccgaggac aaggtggctt ggctaccca ggtgtgcgga 1200
 cccatgggac tctggagagc gtgaatgggc ccaaggcagg ttcaagaggc ttgacatcat 1260
 tggctgacac tttogaacac gtgatagaag agctgttggg tgaggaccag aaagtccggc 1320
 ccaatgaaga aaacaataag gacgcagact tgtacacgtc caggggtgat ctcagtagtc 1380
 aagtgccttt ggagcctcct cttctctttc tgctggagga atacaaaaat tacctagatg 1440
 ctgcaaacat gtccatgagg gtccggcgcc actctgaccc tgcccgccga ggggagctga 1500
 gcggtgtgta cagtattagt gagtgggtaa cggcggcaga caaaaagact gcagtggaaca 1560
 tgtcgggagg gacggtcaca gtccctgaaa aggtccctgt atcaaaaagg caactgaagc 1620
 aatacttcta cgagaccaag tgcaatccca tgggttacac aaaagaaggc tgcaggggca 1680
 tagacaaaag gcattggaac tcccagtgcc gaactaccca gtcgtacgtg cgggccccta 1740
 ccatggatag caaaaagaga attggctggc gattcataag gatagacact tcttgtgtat 1800
 gtacattgac cattaaaagg ggaagatagt ggatttatgt tgtatagatt agattatatt 1860
 gagacaaaaa ttatctattt gtatatatac ataacagggg aaattattca gttaagaaaa 1920
 aaataatfff atgaactgca tgtataaatg aagtttatac agtacagtgg ttctacaatc 1980
 tatttattgg acatgtccat gaccagaagg gaaacagtca tttgcccaca acttaaaaag 2040
 tctgcattac attccttgat aatggtgtgg tttggtgccc ttgccaagaa ctgaaaacat 2100
 aaaaagttaa aaaaaataat aaattgcatg ctgctttaat tgtgaattga taataaactg 2160
 tcctctttca gaaaaacagaa aaaaacacac acacacacaa caaaaatttg aaccaaaaaca 2220
 ttccgtttac attttagaca gtaagtatct tcgttcttgt tagtactata tctgttttac 2280
 tgcttttaac ttctgatagc gttggaatta aaacaatgtc aaggtgctgt tgcattgct 2340
 ttactggctt aggggatggg ggatgggggg tatatttttg tttgttttgt gttttttttt 2400
 cgtttgtttg tttgttttt tagttcccac agggagtaga gatggggaaa gaattcctac 2460
 aatataatatt ctggctgata aaagatacat ttgtatgttg tgaagatgtt tgcaatatcg 2520
 atcagatgac tagaaagtga ataaaaatta aggcaactga acaaaaaaat gctcacactc 2580
 cacatcccgt gatgcacctc ccaggccccg ctcattcttt gggcgttggc cagagtaagc 2640
 tgcttttgac ggaaggacct atgtttgctc agaacacatt ctttcccccc ctccccctct 2700
 ggtctcctct ttgttttgtt ttaaggaaga aaaatcagtt gcgcgttctg aaatatttta 2760
 ccactgctgt gaacaagtga acacattgtg tcacatcatg aactcgtat aagcatggag 2820

ES 2 762 610 T3

aacagtgatt tttttttaga acagaaaaca acaaaaaata accccaaaat gaagattatt 2880
ttttatgagg agtgaacatt tgggtaaate atggctaagc ttaaaaaaaaa ctcatgggtga 2940
ggcttaacaa tgtcttgtaa gcaaaaggta gagccctgta tcaaccaga aacacctaga 3000
tcagaacagg aatccacatt gccagtgaca tgagactgaa cagccaaatg gaggctatgt 3060
ggagttggca ttgcatttac cggcagtgcg ggaggaattt ctgagtggcc atcccaaggt 3120
ctaggtggag gtggggcatg gtatttgaga cattccaaaa cgaaggcctc tgaaggacct 3180
ttcagaggtg gctctggaat gacatgtgtc aagctgcttg gacctcgtgc tttaaagtgc 3240
tacattatct aactgtgctc aagaggttct cgaactggagg accacactca agccgactta 3300
tgcccaccat cccacctctg gataattttg cataaaattg gattagcctg gagcaggttg 3360
ggagccaaat gtggcatttg tgatcatgag attgatgcaa tgagatagaa gatgtttgct 3420
acctgaacac ttattgcttt gaaactagac ttgaggaaac cagggtttat cttttgagaa 3480
cttttggtaa gggaaaaggg aacaggaaaa gaaaccccaa actcaggccg aatgatcaag 3540
gggaccata ggaaatcttg tccagagaca agacttcggg aagggtgtctg gacattcaga 3600
acaccaagac ttgaagggtc cttgctcaat ggaagaggcc aggacagagc tgacaaaatt 3660
ttgctcccca gtgaaggcca cagcaacctt ctgcccattc tgtctgttca tggagagggt 3720
ccctgcctca cctctgccat tttgggttag gagaagtcaa gttgggagcc tgaaatagtg 3780
gttcttgtaa aatggatcc ccagtgaaaa ctagagctct aagccattc agccatttc 3840
acacctgaaa atgttagtga tcaccacttg gaccagcatc cttaaagtac agaaagcccc 3900
aagcaattgc tgcattctag taggtgagg gataagcaaa agaggatgtt caccataacc 3960
caggaatgaa gataccatca gcaaagaatt tcaatttggt cagtctttca tttagagcta 4020
gtctttcaca gtaccatctg aatacctctt tgaagaagg aagactttac gtagtgtaga 4080
tttgttttgt gttgtttgaa aatattatct ttgtaattat ttttaatatg taaggaatgc 4140
ttggaatatc tgctatatgt caactttatg cagcttcctt ttgagggaca aatttaaac 4200
aaacaacccc ccatcacaaa cttaaaggat tgcaagggcc agatctgtta agtggtttca 4260
taggagacac atccagcaat tgtgtggtca gtggctcttt taccataaa gatacatcac 4320
agtcacatgc ttgatggtt atgttgacct aagatttatt ttgttaaaat ctctctctgt 4380
tgtgttcggt cttgttctgt tttgtttgt tttttaaagt cttgctgtgg tctctttgtg 4440
gcagaagtgt tcatgcatg gcagcaggcc tgttgctttt ttatggcgat tccattgaa 4500
aatgtaagta aatgtctgtg gccttgctt ctctatggta aagatattat tcaccatgta 4560
aaacaaaaaa caatatttat tgtattttag tatatttata taattatgtt attgaaaaaa 4620
attggcatta aaacttaacc gcatcagaac ctattgtaa tacaagttct atttaagtgt 4680

actaattaac atataatata tgttttaaat atagaatfff taatgfffft aaatatattt 4740

tcaaagtaca taaaa 4755

<210> 2

<211> 3175

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> variación

10 <222> (2)..(2)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

15 <222> (5)..(5)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

20 <222> (6)..(6)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

25 <222> (39)..(39)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

30 <222> (40)..(40)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

35 <222> (44)..(44)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

40 <222> (104)..(104)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

45 <222> (137)..(137)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

50 <222> (138)..(138)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

55 <222> (139)..(139)

<223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

<222> (206)..(206)

5 <223> puede ser a, c, g, o t

<220>

<221> variación

<222> (326)..(326)

10 <223> puede ser a, c, g, o t

ES 2 762 610 T3

<400> 2
cngcnnaaag atttcttcac agggtccttt aaactgtcnn tttntaagag gtccttccac 60
tacaggtaaa gggaaattcc ctctacccta gggcccctca ggancccttc ctctctcaca 120
cgtttcttcg actgctnng atttaagcat tcagctggcc acgcaacgca agaagcaata 180
agaacacaaa aaccctacc tgttcntoct ctatccgtgg cctttgcoac cacctccaca 240
acctagtcca gattcctctt cttttctcaa gggaacgtct aaagctctca agtccgtttt 300
ggcagggcga ttttgtaagt ctgaancatt tcagtgtgtc tctcgatctc aggcagctca 360
aaagaaaaga tctgctggct gcgtgaaggc gcattagaaa cctgctgcta ccttgcagcc 420
tgggtgagc atatgctccg gaacttgctt ctcttccaac atcctgcacc tcagggttgc 480
acgtctgggt tcccaagccc cggccogctg gcttatgcaa atcacttagg tacatgcaaa 540
agtatccctt ctcccggagc gccattggcc cggggaggtc tcgagctcat tactatgcag 600
agaggagagc cgccattggc caagaggagg accagagggg cgtgtttctc gggcaaattg 660
gatctcctaa attggatgac ctgggctgaa agacaactta aagaccccca gaaaactctg 720
gttttataga taagaaatct gaggctcgag agagagtgtg ttctgcccaa catcatcacg 780
gaacagctcc tgggctcctg gtcctaatc tgtcatcgct gtctggaaca gcgatgactc 840
gatcgcgaga tcaggaaggc ggccogagtgt gtgcgcgagg ccatcaggca cttctccttc 900
ctgcccttgt atgaagaagg atgtgtttgc ttccccttgt gccatgattg taaatttcct 960
gaggcctcct cagccctgca gaactggggc tatagccatg tgactgatct tcgtccaaga 1020
atatgtaaag aaaaagtgtt gagtggctt ttagggctag agcaatgtat cttaggctca 1080
cttaaggaag ctgtagagat gagcccaagg agggaaacca gaagagcccc ccaggctcac 1140
cagttgttg ttggctcctt acaaacatgt cattcaagtg gctaattotta caacagcaca 1200
aattcatcta accagaaaga gaagaggagg ctccaaggc acttgactac tgagcatcac 1260
cctggacgtg tacaagtctg cgtccttatt gttttcttca ttgggocgaa ctttctggtc 1320
ctcatccaac agctcttcta tcacgtgttc gaaagtgtca gccaatgatg tcaagcatct 1380
tgaacctgcc ttgggcccac tcacgtctc cagagtccca tgggtccgca cacctggaga 1440
tactctatta tagcaaagaa gaaagataat ttcattgagc catcctgttt tacagtattg 1500
aattattacc acaaggtacc aaccatata gcatactta tagggtattt tgtcaaaact 1560
atgcatgaag gtcatttgtt tgagatgtca gaacatttcc cgtgagaag atctcattgg 1620

ES 2 762 610 T3

gcattgaaac agaaccacat gctcttcaga ccagcaaccg cgactaccaa atactcctct 1680
gtcaactcta cttgagtaag aacgctttca attaaggcct aagtgtcaac atgcctttaa 1740
aaaaaatcgt ggtgacacaa aatctttctt tttagcacc aacagaatcc cttcaaagcc 1800
tcgtggtctg acaccctatg ctaogtgact tgtgacccat ccatttgtca tgttcttcgg 1860
gaatgtggct aaggggctaa gatgtgactt gaaaagaaag gtagaacaag atcatctcaa 1920
atattattatc aaggaatagt tcagaaaacg acttcagacc acagagacag cagaacagat 1980
ggtccggcat ggatagagca tcagacactc acagactgtg ccaacaagag ccatcgagtc 2040
aaaacagcca aaggaaggag ggtcatggaa tgggttctct cacaccaaac tgatgccag 2100
aggccctcag catgaataac aaaggcaacc agaccacaaa gccatactga gtggatacaa 2160
aacctatacc taggctgaca toccaaatgt gtgtggcaag ttagatgatg atggcacaaa 2220
agacagaaca ccttgcttct gccattgtc agctcttga agagagcaca cttttagagg 2280
agcagctgca aggagcctga gaacaaaact ggaaatgtct gttatgaaag ccttcacagg 2340
aaattctgca agtggcaacg tgggtccatt cegtgtgtgt cactagagct ggcgcaagcc 2400
catggccatg gtgaggcagc gtttccactg gaactaatct gatacctgca ccaactcttg 2460
caactgtgca gtgttcccac tgcaaaactac ggatggggta aaagactgct cacctcctat 2520
ttctcatcta atctcacaca ctctgtttga tgaggctatg gagaaacagg tcttctcata 2580
cactaaagggt gggagtacaa acaattcaag ccctgtgcag gacaattagg caatacctat 2640
caaaattata catgattttt cctgctgacc cagcaattcc acttttgga ataattgaca 2700
gatatagggtg catatgtaca aaatgatgga aagctctctg gtatatatta gtaagtgata 2760
aaacaagggtg tgtgtatata tggctactac cttttgtttt aaaaatgggg gaaaatgggtg 2820
gagcttgagg tgagccgaga tcgtgccact gcactccagc ctgggagaca gagcgagact 2880
cogtctcaaa aaaaaaacag ggtgggggtg ggggaaata atagtacata ctcatattta 2940
cctgtatcta tataaaacac actatcaagg attcacaaga aactaataca aatgatcccc 3000
ttatagatgg tatgtattgg gggatactga ggtgagcagg gtataagtgg ggcaagactt 3060
ttcagtgtaa acttctttta aattttattt tgatttttga ataatgtaa ttaactgtca 3120
aataattaa ttaaaaataa ccaatttatt acaaaaaaaa aaaaaaaaaa aata 3175

<210> 3

<211> 15

5 <212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
5	<400> 3	
	cttgaattgt ttgta	15
	<210> 4	
	<211> 15	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
15	<400> 4	
	agttgcaaga gttgg	15
	<210> 5	
	<211> 15	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
25	<400> 5	
	atctgttctg ctgtc	15
	<210> 6	
	<211> 15	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
35	<400> 6	
	catattcttg gacga	15
	<210> 7	
	<211> 15	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
45	<400> 7	
	tgtgctgttg taaga	15
	<210> 8	
	<211> 15	

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
5	<223> Oligonucleótido antisentido		
	<400> 8		
	tgacagagga gtatt		15
	<210> 9		
	<211> 25		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia de ensayo		
15	<400> 9		
	gcacacctgg agatactcta ttata		25
	<210> IO		
	<211> 25		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia de ensayo		
25	<400> 10		
	cctgcagaat ggcttgaat taaa		25
	<210> 11		
	<211> 46159		
30	<212> ADN		
	<213> Homo sapiens		

ES 2 762 610 T3

<400> 11
 gtaaaccaat agccccatg ctctgtgcga tttcattgtg tgctcgcggtt cgcaagctcc 60
 gtagtgcagg aaggtgcggg aaggtgtgtc tgtggcccgg gaaacgcaog coctctccca 120
 gagaacttgg gtgctgggat ggggaggaag gggagagttg aaagctaggg gagcgagacc 180
 tcggggcgtg cgattctcac tcgctccctc ccgccccagc gcccacagcc ggggtttctg 240
 cagagggcgc gggacgcggg gttccccggg gctgaggctg gggctggaac acccctcgaa 300
 gccgcggggc tcctgtccaa ggcgccccag gaggggcgcag gactcgcagg gcgatgtcgc 360
 ggggccctag gggaggaggt gaggacaggc cccgggggag cggggagttc cgggcgcccc 420
 tcggttcccc gcgcgaggaa aagacgcggc gttcccttta agcggccgcc tcgaacgggt 480
 atcggtagcg cgggcgagcg gggagcgggg ggcggggggc gggggggggg gggcggcgcc 540
 gtttgaccaa tcgaagctca accgaagagc taataatgt ctgaccggg cgcaaggcgc 600
 agcctggagc tccgggtccc cgacgctgcc gccgcgcgc ccgggcgcac ccgcccgctc 660
 gctgtcccgc gcaccccgta gcgcctcggg ctccccgggc ggacagagga gccagcccgg 720
 tgcgccctc cacctcctgc tcggggggct ttaatgagac acccaccgct gctgtggggc 780
 cggcggggag cagcaccgcg acggggaccg gggctgggcg ctggagccag aatcggaacc 840
 acgatgtgac tccgccgccg gggaccctg aggtttgtgt ggaccccag gtaggcaagc 900
 gctgggaatg gggcttggg caggagctgc ccgtccgcgg gagagagttg actgggggat 960
 ccccccccc aaagttgtgg gacgaggeca gtctccttct ttcctccct ccggtagaag 1020

ES 2 762 610 T3

ggacgatttg gagttactct tggggagttt tctccccat cccacaacct agaaggtcag 1080
 ccggcaccac cagggaaaaa gggaccggg gaagtcacga agtagaggag ggaaggcctg 1140
 gaggagacc agagctgctg gatgggagca aagacggcga cccggggatc cctcgcagcc 1200
 ctccccagc ccaggagtag tcgagagaga cttagggggc cagagctgtc gagggctctg 1260
 actgagggga ggggtgctggg gctaggctag gaatccttc aggggggtggg tgggtccccg 1320
 gccgacttgc ggggggagtg ggaggggaagc ttgcgccttc agcccgcatc ccttccccgg 1380
 agctgcacac ggctacctgc tcccagga ttgagactga agtgactta caagtccgaa 1440
 gccaatgtag cttggaaac ttgggagggc gaattcctac cgctgggaac tgaaagggtc 1500
 tgcgacactc tcgggcagc cgaaccaca tctctacca tcctgcgcc ctcttctgaa 1560
 gcgccctcca ggaagttaa gagttttgac tttcggggag tggttgggat gtacgtggg 1620
 gattcttgac tcgggttagt ctctggggat gcagagccgg gaagaggaat ggggtgagtga 1680
 gttactcctg gaaagaaata gctgaggatt ggggctctg tgcctgacgg gcaagaagaa 1740
 ggggagatta cagactagg gcatccctaa ggaagaagcc tcggggctgc gagggtgaa 1800
 tggaggatgc agtgtttgtg tgttgggggt agagcgggga tgagggaccg ggggtgaggg 1860
 gaggcgagga ggaggagggg acccagagaa cgaagctagg gaaggtagag ggtgccctct 1920
 gccggccatg ctgccaaagag cagctactgg gggcgggagg ctgggggtgg ggaagtggta 1980
 aaggaaggtt ttgcgggatc ccttagagag ctgtaggag ggacttggtg aatggtgctg 2040
 ctgactccag ctoggtgggg cgtgcgactc gtctcggtg gattttgact cctcgttctt 2100
 gtttgcttc tatgcaagt tctctcgcg tgggggagct ttgataagcc tcgattggcg 2160
 gtgtgttagg gcttcttga tcttatttta gggctctta gttatcctgc acttactcct 2220
 taatgtcagt agcaaccaa gaacatttc cgacaagcac gcaggaatgt tcttgccag 2280
 aagcaaagaa aggcataatt ctgagtgtt attaatctc ctagtaatct ttaaagcaa 2340
 agtaatatgt aattgggaac gttgatttc taactgcata taaaaggcga catgatatta 2400
 aatgagacc ctcctactg actcaatc ctgcaaatc tctctctcc ctttattatt 2460
 atggaaaaat ctatttttat atgagttgt tgtaaggctc aaagccattt tggctctaca 2520
 atttgatatg tctttacatt ttaacttatt gaggcataat tacagattta atttgatga 2580
 acgtgtgtgc cttcaatgct tatctcatgc aacataattt ttaggttga gatttctgat 2640
 gttatggcat gtagcgttc aaggcattac acataatagg taacatagca tgttgaaatt 2700
 acaccacaaa gttttgacc tgggaacagc accttttaa aacaatcact aaactcctgt 2760
 tctgttttc tgattttgca aatgccttc ttaagacttt ttttttttt ttttttttt 2820
 ttttttggg aaatttacct ctgggttagc aggagaggta aaaaaagga aagagacact 2880
 tgttgaatg taaccataac ctttactgga atttaaaaca tgttgggtcac cttactgga 2940

ES 2 762 610 T3

attccagggc cataaagtcg ttgtotTTTT tttcttctac ttcattttgt aaaatgtgat 3000
 aaatgttggt aaatatagac cagtagtaag tattatgaca ctaaaagcat tatgtatgtg 3060
 gaactatTTT aagttattac agaacatTTT ctatTTTataa atgatataag cagaaagaaa 3120
 tgatttccag ataaacaagg cttacgtaca tgttttgaag cattagaaca ttgcagacac 3180
 tcttagacat cacatTTTT aaagcaaaat aacagtaatt tttcacatac ctttgagacc 3240
 tttcatagcc cattcagagc tgagttagta gctggaagtt tcctttattt taaggTgata 3300
 ttttaaaacc atttaacatg tatagtaggt caacattggt gcatccagaa aatgaagcat 3360
 ttaggaaatc tgtttcagtg tcttttcaat gtgtgtaact tttacttgca aaccaatgga 3420
 accaagaaag tcatcatttg cctaaaatgc agtcatcacc tcaaatgatt catttatact 3480
 atgtgagtta attgccttca tctcattaat ggccaaggag ggaagggagg tcttgggta 3540
 tttcttgTtc attttgactc accaggaggg aaaatcctgt aaaaaagaa atgcaaattt 3600
 ctaaaatcct ggctcaaagt ccgtgggttt cctgttttaa aggggGccca tgaaaatgta 3660
 agctattccc ttttctctgg aatctttaag agtccagct tttcaatagt caaaatgtag 3720
 atgattgata tcatttctta tatgaatagc actggtttgt agttcagcac gcacagtgag 3780
 ctgggcacgc ccacctgata gtatagcaga gaacttgTtt acattctttt tacattcatc 3840
 ttctaaaacc tggggTgctc tctctctctc tctctctctc tctctctctg tgtgtgtgtg 3900
 tgtgtgtgtg cgtgcacgtg cgcgtgtgtg tagaggggga gagagagaga gagagaactg 3960
 tgaactgtga aatataacac agccagcagc tttgggtctc aatcgtagac ttactcttaa 4020
 ggaaatttac agaatggaaa ggtcatgttc aagtagttta ttaacatTTT gagatgtagg 4080
 aaattaatcc cggagtacag aagaacaatt tcagacttcc tgaataaaaa cagacagcat 4140
 agagagtgga tgatagctaa actctgaata tcttttgaga agaaaggcac tccatttca 4200
 ggtgcccata atatggattt gatTTtagtg attaaaacat taattttcaa cttgcatctc 4260
 cctgtgtgga agagttcaat ttgtgtgagg ggtctgcct atccaacaaa agtgaatatg 4320
 tcctttttat agggtaattg ctaactgtc tcaactgtt ttcaaacaat tgttatagag 4380
 cactcagttt ccactaattg caaaattgTt gcttaattga aggactctca gccatctagt 4440
 gcagccattc agccactggc aggctctgtg atctcaaact gtgaattgca ttttaagag 4500
 gaatcgagga gagaattctg tggaaattcta ggttttaagt gctggctgtt gttcaatgga 4560
 agaggaaatc atttgaacaa gaatcgcac aagttgtgtt gtgataaatt ttctttatta 4620
 ggatgaataa catgcacaga tgagcttcaa aagtgaatga gcaaacctac tggttacact 4680
 ctgcatocat ttactctgtt tagtatggag taatgttagg caataaatga tgctggcaaa 4740
 tgaaatccgt atgttatttg catgtggtat ttaaacctag gaaacataga gtggctttg 4800

ES 2 762 610 T3

tattttagg cttagtcag tgtgtcctaa acgtcctctt aaacttctac ttaaggcata 4860
gaattattta atcctaaata attttatact taagtgcctc actggatttc cagaatattt 4920
acactgtaaa gatttagaaa ggtcatgaac ccaattattg actatatgga atcattattg 4980
atggcagatg caaaatggag ctcaactaat tactgacatt gaaaaccttt tgcaggggag 5040
aggaggggga gtggtaaatg tgtgtgttct ttaagtggaa caggaaggta ttctcttttc 5100
tgtagaaaaa tttgagtatc tggtcagata agtgtggaag ctttcattta aattaagtat 5160
ttaagttcaa gtagaagctc tagggcactt atcctcttga tgagacaaat cttatcaaat 5220
atactagatg ctaagaagtg gctcattgcc ctgatgtctc atttatagat tgatgtttga 5280
ggatgggttg cattaagtga gttagggggc tgagtgtggg acaggagaac gattggaagg 5340
aagcaaagta aatttacaag ctttagtgac agccataata aagtaaaagt ttatttccag 5400
agagcctaga gagtaaggaa cgttatatag ttttcccaa aggttcaact gaaagaactt 5460
ttcattgggtt gtcatggtag taatgtcctg attttgaaat ctcccagaac ctagtagctc 5520
ttaaacatgc tttcatcttg gttcctttgg tctgacggaa actttatgac gaccctctgt 5580
gtttttgaca tgcctctgca tttttggaga gaggaggta ggcaagggag gatttcttaa 5640
aactaagaca gtatagtaag gaaacataaa atttatgat aaaaaatcac tgaacttcaa 5700
attgacttac tgaataaaaa cctagaaggc aacctgtcgt ttaattaca ctagcttgta 5760
taaaattaaa atttataaaa tgggaattca aagaaaataa acgggcagtt ccaagtaatt 5820
taagcaactc accaaaaatt gaagtaatag tgccacctag agaacaaaat caccagcttt 5880
actagccaaa tggcttattt ccatatgaac ctttttcca acgctacagt tactaggatt 5940
tccttgttac catattcaga tcttgtgagt gtgtatgggg gtgggggttg catgtggaat 6000
tacagatgaa attttaaaac aagcagatcc acaatttgat atatgcacta aatcctttta 6060
acgttghtaat gtagccaaat gtagaatagc atgccaggaa tcaacggcta gcatcctttt 6120
taacatttat tttttcatg gatatgtacc aaaccgaacc attgagtata aaggttctga 6180
ttttatttat ttgctacagg caattcatta tactttctga gatacaataa caccaaataa 6240
tttgagtaga gagaccctta agaatgtttt cgatttatga tctaccttta actttaatgt 6300
actcagaaga tgtgagaata aaataaagtc aaatataagc aagattttta acacacacac 6360
aaaaaacaaa caaacaagaa aaaggaagaa aattataagg attgccttaa ccttagaata 6420
gatgaaggta tacatctgag ccagcaccaa aaaaaaaaa aaaaaaagt atggaaccag 6480
gaaccaataa ttacaaattg acttaaaatt cttggatgac aaaaatctat atttagttca 6540
tttttgcag cccccacaac agcatccaaa acagttcttg ggaggcactt tgataaatgt 6600
tgctgaatgc actaatagat tgattaatgg ctgcttcaga ttatcactag tgatgtagac 6660
agaaacttca tgaaaatggt ttgtcttgct ggaagaaagg cagaaattgg aggaaaaggt 6720

ES 2 762 610 T3

ttaataatat ttttcccag tacctattat aaaagtcatt tagttggctt agttctataa 6780
 tttcttatgt gtaatttgat tcacttatga aattgtgaat atatgaaatg ttaaagttga 6840
 tttagacagc aactataagc ttgtggattt tcttttaaat gtcttcaaat ttttaaagtc 6900
 cagtggagat gccagcgact gtgcttcagg gagtagaata tagtatatct taaatttgtg 6960
 ccaatttctg gtaagcagag aaaaaattgc atgataacca aagaaagtca tattgtttgt 7020
 gctttgtggt attcatggaa gcaatcaggt gcagaaaact ttctttttca gaaaaaaaaa 7080
 attactaaaa taaaggtgcg tgtgtgtgta tgcacatata tctaaagga gagagggaga 7140
 aggaaactta ctaaataaaa ttttggccac atgggattta gtctaatacag tcttggtttt 7200
 ggagttgcta tcatcagtag ttccattttg tgattctttc tttctgcctt catgtgcctt 7260
 tgaaaactga aactatgcc aaattaanao aagttttct gtcttttcac atgttcactt 7320
 atttcttgaa tgtgttttta aacacagaca aacttctttt acatcatgta gaatctgaag 7380
 gtcgagaaat ttgcagtcac tttgctggag agagatgctt ggcggagtcc caggccacat 7440
 tcctaggcca aactctcgaa ggtattctctc ttatgcaaca ttgggaaaat acatccagca 7500
 ccgacatggt ggctgataat gtgtctgaag gcacagacga tatgcttacc atatgaaaca 7560
 taaagccagc agatattgca gacattctgt tgaatgatag aatctggatc atttacattt 7620
 acttaaatgt aaaatactat gattaagtac aaaaaaatca atttaggaga gaatagagag 7680
 ttgcgggcac ggttttaggg gatgacttat cagcagattg tagaaaggaa gcttgaatgt 7740
 tttaaattaa ctgcaagttc agtataagcc agtgggtgga caagaggctg ttatcatagc 7800
 tactgaaatt ttgggctgca ctgctagaaa tataatactg aatggagaa gctaataatt 7860
 cttcactttt taaatagact gtatctagaa tattatcacc agttcaagga aatgaaataa 7920
 gttgttttag gtacatcacc gataaattag tgtacattca aatcactgtg accaggatgc 7980
 atagggaaatt tgaaagcatt gcatgtgagc aatggttgag gggacttggg atgcatgact 8040
 tagggacaag aaaacttagg ctggaatggc aagtggtttt tgaatgttgg gttgagaaga 8100
 attctaaaac tgtgaaggat tagtaaaaat aacattcaga ttgctaagtc ctactgtggc 8160
 tgggagatta gagtgtcaac atgtgtgatg tatttttgac atccttattt tgaggatggg 8220
 cttcaagat ttgacgaact gtcataagtg taatttgtgt tgcttcagac agcagttcta 8280
 gaaccaatga tgtaaattha gatactctac atggtagtta gaaaactttc cattaattta 8340
 atttagcaaa tattgaatgc tcactgcata cagagcactt tattagagga atatataata 8400
 aagaaaaaag aggtctggtg tgggtggctca tgctgtaat cccagcactc tgggaggctg 8460
 aggtgggagg atcacttgag cccaggagat cattacgagt ctggacaaca tagcaagacc 8520
 ccatctttac aaaagacaaa aaaaattacc caagcctggt gacaggcact tgtagtccca 8580

ES 2 762 610 T3

gctacttggg aggctgagggc agtaggatcg tttgagccca ggaggttggg gctgcagtga 8640
gccgtgattg tcccactgct cttcagcctg ggtgacagag tgagaccccg ttggagggaa 8700
ggaaggggaa gaaggaagaa aggtaggaag gctgaaatga aacccttta gaaatgacac 8760
taaaatggga ggttgagta aggtattttc tgaagtgcct ttgtacttgt ttttttctaa 8820
tgcattggcc ataagtctgc tccttattta tagtccataa acaatcctaa tgagaacagt 8880
tatatatttc tgcctttgaa tcactactt gaagtgttta gcatcatgaa ttgagtatca 8940
gaaatccctc ccatttcttt gcaaagcgct gtattttact tttccttatt tgtatacaga 9000
ttctcaaaat tggctatfff tcctttgggt tagacagaac agaatgtctg gaaaaaaaag 9060
ttcttatcaa attcaggtgc ccaaattgct taagaaatta acttttgagg ttatattttt 9120
ttagggttca gtactaaac taagaaaact tctcacggt caccttcaact tttggaaacc 9180
acaaaatctt cagatattac agttttccaa agagtttctc tttttaaata taaactaaaa 9240
ggaattgact cctccoccaa ctccctcagg cctcagcatg gatagagtta ctttttttct 9300
ttaataattt atttataact tattttgctc ttctgtagaa cagctggaga ttaagcaaca 9360
tggccatgac ataaaatgca agttagacca taagatgagc agccactcc aagtatgaat 9420
gagtacttat tctttgtgat ctctcact gcttttaggt attaatagtg tcagtcagca 9480
aagcaaacag ttaaatattt acatctcctt taggatatca tatagtttat agtttgtatg 9540
tgttcttgcg tgtatgtttt cttctgtttc aaattctttt ttcttaaagt aagaatgtta 9600
tatgtagcaa atggttcttt cattaattca tttgttaatt cacctgcat taattgagtg 9660
cccagtgagt gtcaggcact gggctacttg gatttctttt ccctgtattg atccatata 9720
cttcaggtgc tccttgatat ggctctccat tgactctctc atataaggct ttcattacct 9780
attcacatac tcctoccaa agaggactgg tccaaaagta aatcttgag caagttctct 9840
gagttatttc agaacttctt gccccaaac tgtattttta attattgact ggtagcattt 9900
tgaataact tacctctctt ttttaagat tgaagttctt taccctctct gattttcagg 9960
tgtcagtttg tgtacaaatt gagacaataa aaatgtttgt tagacatttt cttaaagcat 10020
tttgctatgt gagaatcttt catgaagaac tctttttaac aatgactcta tagcagaagc 10080
cacagtagag ggagaactac tgaatcaaag atggtgtttg agtctatgat tttatgatgg 10140
atftttttt tttttacata caaggatag catgggtctt ttagtattca ggaatctgtt 10200
cttcacttga cagtatttat aaattgtgtg tttccccta aaaaaactta aattgtgaga 10260
atgcttccat ttactagaag ttggttaatg attatgccaa ataaggaaaa taagacagaa 10320
aaatcagttt agtgaatact attttgcctt taaatttagt aatttagtaa cagtatctct 10380
ttggggttta ctagaacca ctttttaatc caataggtct ctttcattgt gaagtcagga 10440
ggtgatfttg cttaaagtgt tagtatagga atctatatgt ggtgttcaag gatcatgtaa 10500

ES 2 762 610 T3

atatgctgat ataatcggag cacagtttgg catcattaac tcagaaatat ttaaactcct 10560
 gctatacaac atggaagcaa acttgtgcat agtttgtgtg tgtgtgtgtg tgtgaatctc 10620
 aaaaaaagaa aaaaatcaca ggatcaggaa gtoggaatag gtcccacttt tcttctagta 10680
 ccaaacctac agccatgttc ctagccttct cttttactcc caagcaagac agacaggcaa 10740
 atgaccatcc tgctgcccat ttctgtgtat attcacttgc attgagagt gtattcacct 10800
 gcttgttgag agtattcaca aatggtacct gataaagtag atacttcttt aaacatgtga 10860
 atttttttgc attgtataat gtttagaaat aatcatgtat aaatggttga atattaatac 10920
 aggattgcct tatcaagtat ttattaatc attaaaatgt ggtgtcatta atacaattta 10980
 ttttaagtgc ttttcctaaa ataccagatt atttttctga ttttcacatc cctgacaatg 11040
 actttcttaa acttggtagc caggaacaga aaacctaa caactgcttc tcaactcataa 11100
 gtgggagctg aacagagaga acacatggac tcagggaggg gaaccacaca cactggggcc 11160
 tggagcaggg gcaggggaa gggagagagt gcgtcaggac aaacagacaa atagctaatag 11220
 catgcgagcc ttaataccta ggtgatgggt tgataggtgc agcaaaccac catgacacat 11280
 attacatct gtaacaaacc tgcacattct gcacatgtat cccggaactt aaagtaaaat 11340
 aaaaaataat aataaaataa aataaactta gtagcatcta ttgttccaga gcctgtaatt 11400
 gctcttcagg cagtctcaca taaaaaccta ggagaacctt cactgtcact gttccatgag 11460
 gtgttaggaa aacttgcctc actgcagtgc cccagtaggc attggtactg agacccaaat 11520
 tcagctggtt tgttgttact acgattccta cgtgatttca cttgtcatgt agacaagatt 11580
 gcacacttca ataataatct tgtccaaatg tgtggtattc catacatttt taaaatgcat 11640
 tcacatatct cattccattt gatcctacaa ataactctat aaaaagatt ggcagacatt 11700
 atttctatat aacagaggag gaaactggag cttagagaag ctaaatagca atccaaaatg 11760
 cacagctgta gaaccagagc aaggatgata gccagtgac ttcacctaac ctagtcccct 11820
 taccaccact ccagctgtct ataaccaaaa cctgcagtat tcaagtaaga aaccatatct 11880
 tgccttgat gcattaatgt gagacctgga gcaggaacag gctgatattg tcaccctggc 11940
 ctactgtcca ctttgtctc cagcagagac tggtagcctt ctgtgtgcca aggaataaag 12000
 tggtaatggg aagattaaaa atgttttttc caaggagttt ttttaattta tttttttaa 12060
 aaagaaaaaa ctcttagagg gaaaaatgaa tatatgactt ttgatgtatt gttccttagt 12120
 aacttagtta taattttact taaacctgag actcttgcta agtgaatgat tagaaatatt 12180
 aggtggtgg ccagatggca aataggaaca gctgcagtct gcagctccca gagagatcaa 12240
 tgcagaaggt ggggtatttc tgcatttcca actgaggtac cgggctcatc tcattgggac 12300
 tggttagaca gtgggtgcag cccatggagg gtgagccaaa gcagggtgga gcattgcctc 12360

ES 2 762 610 T3

actcaggaag cgcaaggggt caggggaact ccctccocta gccaaagggaa gccctgaggg 12420
actgtgccat gagggacagt gctatctggc ccagatacta cacatcttct acagtctttg 12480
cagccggcag acccaggagat toccttgggt gcctacacca ccagggccct gggtttcaag 12540
tacaaaactg ggtggccatt tgggcagaca cccagttagc tgcaggagtt ttttctcata 12600
ccccagtggc acctgaaatt ccagtggagc agaaccattc actcccccg aaaggggctg 12660
aaggccaggc agccaagtga tctagctcag cagatcccac ccccatggag cacggcaag 12720
taagatctgc tggtttgaaa ttctcactgc cagcacagct gcctgaagtc aacctgggat 12780
gctccagctt ggtcggggga ggggcatccg ccattactga ggcttgagta ggctgtttc 12840
ctctcacaat gtaaacaaag ccaactggaa gtttgaactg ggtggagcct accacagctc 12900
agcaaagccc ctgtagccag attgcctctc tagattctcc ctctctgggc agggcatctg 12960
ggaaagaaag gcagcagccc cagtcagggg cttatagata aaactcccat ctcatgggac 13020
agagcacctg ggagaggggg tggctgtggg ccagcttca gcagactta atgttctttg 13080
cctgttggt gtgaagagag cagtggatct ccagcacag cacttgagct ctgctaaggg 13140
acagactgcc ttcttaagca ggtocctgac cctcgtgatt cctgagtgagg agacacctcc 13200
cagcaggggt cgacagacac ttcatacagg agagctctgg ctggcatctg gtgggtgcc 13260
ctctgggaca aaccttcag aggaaggaac aggcagcagt ctttctgtt ctgcagctc 13320
tgctggtgat acccaggcaa acagggctctg gagtggacct ccaccaatt ccagcagacc 13380
tgcagcagag gggcctgact gttagaagga aaactaaca acaggaatag catcaacatc 13440
aacaaaaagg atgtccacac gaaaaccocg taaaaaggtc gccaacatca aagatcaaac 13500
atagataaat ccacaaggat gaggaaaatc cagcacaaaa aggtgaaaa ttocaaaaac 13560
cagaatgctt cttctcctcc aagggagcac aactctttgc cagcaagggg acaaaaactgg 13620
atggagaatg agtttgatga attgacagaa gtatgcttca gaaagtgggt aaaaacagac 13680
tcctccaagc taaaggagca tgctctaacc caatgcaaag aagctaagaa ccttgaaaaa 13740
aggttgagg aattgctaac tagaataact agtttagaga agaacataaa tgacctaatg 13800
gagctgaaaa acacagcacg agaactctgt gaagcataca caagcttcaa taactgaatc 13860
gataaagcag aggaaaggat atcagagatt gaagatcaat ttaatgaaat aaagcatgaa 13920
gacaagatta gagaaaaaaa gaatgaaaag gaaggaacaa agcctccaag aatgtggga 13980
ctatgtgaaa agaccaaacc tacatttcat tgggtgtacct gaaagtggcg gggacaatgg 14040
aaccaagttg gaaaacactc cttaggatat tatccaggag aacttccca aactagcaag 14100
acaagccaac attcaaattc aggaaataca gagaacacca caaagatacc cctcaagaag 14160
agcaaaccoc agacatgtaa ttgtcagatt caccaagggt gaaatgcagg aaaaaagtt 14220
aagggcagcg agagagaaag gtcgggttac caaaaaggg aagccatca gactaacagt 14280

ES 2 762 610 T3

ggatctctca gcagaaaccc tacaagccta caagccagaa gagagtgggg gccaatatcc 14340
 aacattctta aagaaaagaa ttttcaaccc agaatttcat atccagccaa ctaagcttca 14400
 gaagtgaagt agaaataaaa tcctttacag acgagcaaat gctgagagat tttgtcacca 14460
 ccaggcatgc cttacaagag ctctgaag agtactaaa taaggaaagg aaaaaccggt 14520
 accagccact gcagaaacat accaaattgt aaagaccatt gaaactatga agaaactgca 14580
 tcaactaatg ggcaaaataa ccagctaaca tcataatgac aggatcaaat tcacacataa 14640
 caatattaac cttaaataa atggggctaa atgcccacat taaaagacca cagactggca 14700
 aattggataa agagtcaaga cccatcagtg tgctgtgttc tggagacca tctcacatgc 14760
 aaagacacac ataggctgaa aataaagga tggaggaaga tctaccaagc aaatggaaag 14820
 caaaaaaaaa gcaggggttg caatcctagt ctctgataaa acagacttta aaccaacaaa 14880
 gatcaaaaga gacaaagaag gccattacat aatgataaag ggatcaattc aacaagaaga 14940
 gtaactatc ctaaacatat atgcacccaa tacaggagca ccagattca taaagcaagt 15000
 tcttagagac ccacaaagag accaagactc ccacacaata atagtgtgag actttaacac 15060
 cccaatgtca atattaggtc aacgagacag aaaattaaca agcatattca ggatttgaac 15120
 tcagctctgg acccagtgga actaatagac atctacagaa ctctccacc catatcaaca 15180
 gaatatacat tcttctcagc accacatcac acttattcta aaattgacca cataattgga 15240
 agtaaaacac tcctcagcaa atgcaaaaga atggaaatca taacaaacag tctctcagac 15300
 caaagtgcaa ttaaattaga actcaggatt aagaaactaa ctcaaacca tacaactaca 15360
 gtggaaactg aacaacctgc tcctgaatga ctactgagta aataacaaaa agaaggcaga 15420
 aataaatata ttatttgaga ccaatgagaa taaagatata acataccaga atctctggga 15480
 cacagctaaa acagtgttta ggggaaattc atagcaataa atgccacag gagaaagcag 15540
 gaaagagcta aatcaacac tctaactca caattaaagg aactagagaa gcaagagcaa 15600
 acacattcaa aagctagcag aagacaagaa ataactaaga tcagagcaga actgaaggag 15660
 attagagaca caaaaaaccc ttcaaaaaaa tcagtgaatc cagaagctgg ttttttgaaa 15720
 agattaacaa aatagataga atgctagcca gattgataaa gaagaaaaga gagaagaatc 15780
 aaatagacgc aataaaagat gataaagagg atatcaccac tgatcccaca aaaatacaat 15840
 ctaccatcag agaacactat aaacacctct atgcaataa actagaaaat ctagaagaaa 15900
 tgaataaatt cctggacaca tacaccctcc taagactaaa ggaagaagtc aaattcctga 15960
 atagaccaat aataagttct gaaatcgagg cagtaattaa cagcctacca accaaaaaaa 16020
 gccaggacc agacggattc acagctgaat tctaccagaa gtacaaagaa gagctggtac 16080
 cattccttct gaaactattc caatcaatag aaaaggaggg aatcctccct aactcatttt 16140

ES 2 762 610 T3

atgagtccg catcatcctg atacaaaaac ctggcagaga cacagcaaaa aaataaaatt 16200
gtaggccaat atccctgatg aacattgatg caaaaatcct caataaaaaa ctggtaaact 16260
gaatccagca gcacatcaaa aagcttatct accatgataa tttggcttca tccctgggat 16320
gcaaggctgg ttcaacatat gcaaatcaat aaagataatc catcacataa agagaaccaa 16380
tgacaaaaac cacatgatta tttcaataga tgcagaaaag gcctttcata aaattcaaca 16440
gcccttcctg ctaaaaaact tcaataaact aggtattgat ggaacatata tcaaaaaaat 16500
aagagctatt tatgagaaac ccacagcaa tatcactctg aatgggcaaa agctggaagc 16560
attcatttga aaaccggcac aaaacaagga tgccctctgt caccactcct attcaacata 16620
gtattggacg ttctagccag ggcaatcagg caatagaaag aaataaagca tattcaataa 16680
ggaagagagg aagtcaaatt gtctctgttt gcagatgaca tgattgtata tttagaaaac 16740
cccatcatct cagcccaaaa tctccttaag ctgataagca acttcagcaa agtctcagga 16800
tacaaaatca atgtgcaaaa atcacgagca ttcctataca ccaataatga caaacagcca 16860
agtcatgagt gaactcccat tcacaattgc tacaaagaga ataaaatgcc taggaataca 16920
acttacaagg gatgtgaagg acctctttaa agagaactac aaaccactgc tcaatgaaat 16980
aagagaggac acaaacaaat ggaagaacat tccattctca tggataggaa gaatcaatat 17040
cgtgaaaatg gccatactgc ccaaagtaat ttatagatcc aatgctatcc ccatcaagct 17100
accattgact ttcttcatag aattagaaaa aactacttta aatttcatat ggaacccaaa 17160
aacagcccgt atagccaaga caatcctaag caaaatgaac aagctggagg catcatgcta 17220
cctgacttca aactatacta caaggctaca gtaacccaaa catcatggta ctggtacata 17280
aacagataga tagaccaatg gaacagaaca gaggcctcag aaataacgcc acacatctac 17340
aaccatctga tctttgacaa acatgacaaa aacaagcaat gcagaaagga ttcctatatt 17400
aataaatggt gtcgggaaaa ctggctagcc atttgacaga aactgaaact ggacccttc 17460
cttacacggt atacaaaaat taactcaaga tggattaaag acttaaacat aaaacataaa 17520
accataaaaa ccctagaaga aaacctaggc aataccattc aggacatagg catggcaaaag 17580
acttcatgac taaaatacca aaagcaatgg caacaaaagc caaaattgac aaatgggatc 17640
taattaaact aaagagcttc tgcacagcaa aagaaactaa catcagagtg aacaggcaac 17700
cgacagaatg ggtgaaatth tttgcaacgt atccatctga caaaaggcta atatccagaa 17760
tctacaagga acctaaacaa gtttacaaga aaaaaacaa ccccatcaaa aagtgggcca 17820
agggtatgaa cagatgcttc tcaaaagaag aaatthtgc tgccaacaaa catacgaaga 17880
aaagctcatc atcactggtc attagagaaa tgcaaatcaa aaccacagtg agataccatc 17940
ttatgccagt tagaatggcg atcattaaaa agtcaggaaa caacagatgc aggagaggat 18000
gtagagaaat aggaacactt ttacactgth ggtgggagtg taaattagth caaccattgt 18060

ES 2 762 610 T3

ggaagacagt gtggtgattc ctcaaggatc tagaaccaga aatatctttt gaccagcca 18120
 tcccattact gggatatac tcaaaggatt ataatcatg ctactataaa gacacatgca 18180
 catgtatggt tattgtggca ctattcacia tagcaaagac ttggaaccaa tccgaatgcc 18240
 catcaatgat agactggata aagaaaatgt gacacacata caccatggaa tactatgacg 18300
 ccataaaaaa ggatgagttc atgtcctttg cagggacatg gatgaagctg gaaaccatca 18360
 ttcttggcaa ggtaacacag gaacagaaaa ccaaaccaca catgttctca ctcataagtg 18420
 ggagttgaac agtgagaaca catggacact gggaggagaa catcacacac tggggcctgt 18480
 caggggtgtag gaggctaggg gagggatagc attaggagaa atacctaag tagatgacaa 18540
 gttgatgagt gcagcaaacc accatggcat ctgtatacct aggtaacaaa cctgcacggt 18600
 ctgcacatgt accccagaac ttaaaagtat tattattatt attataataa taataataaa 18660
 agaaatacaa taaaatagaa tgcagcatac agcagtgatt ctcaaacaca ttcagcatca 18720
 gaattaccct tgaatcttta aatatatat acatatgaga tcttagtctc caagatttgt 18780
 aagtttggtg ttgggtccct gggcctatgt tgggtttaga aacttctaca gatggttgg 18840
 atgtatggga cagtttaaga atcgctgaac taaaatcaa taaactgaat atcctgtgat 18900
 ttagagagac ttatogttta tttcactatc caagtacttg cattagagcg tggctagaag 18960
 ggatttgcag ccttgtaaat aatcagaaat tcagacattt tgagatgaga gaactgctga 19020
 agattttatt ctgacttgaa ataaattttc taattagaaa cttccaggtg agagcaaagg 19080
 cctggaacaa tattcctgag ccagaggagg atcgagtttg actccaggcc taacacttac 19140
 taggtctatg accttgggtc agtaatttaa attctctgta tctcaacctc tcaacagggt 19200
 attggtaggg attaaatgtg ttagtgtctg tgaagtgcct agagcagtc ttggcatagt 19260
 aaatgcttaa tgaatttcag ccaactgtttt tatttttagt actttccagc tccccaaaa 19320
 agatactttt tttagacttg tattaagaca ataaaaagt taatcagcat gcttcatacc 19380
 taaatatgct tcaactttata gcaaagtta caagactaaa actgttttgt tgtaattctc 19440
 tgagtctcat gtgtttatta atgatttttt ctgctgttta ttcacttgaa ttctactcat 19500
 tcttcaagac ctagctggaa tctgtttct agaaagactc ttgccataa taataaacct 19560
 gccctatctg agttcctagg tggctgttac ctcataattt ggtaattaat tgtatatgca 19620
 cttatataac aaaacattat tgtgtgtctt tgctgtatca gattctaggc tggaagttgt 19680
 agatatgatg tttttgtcta gaaaaatgt ctagaatgtc ctactcagga cagtctgttg 19740
 actttaaaga cacatttcct aaacagacac ttcattgaggc agcccagcc tgtacctgtg 19800
 ttcttggacc tgatgatcaa gtttgattta agcctcacca ctactagct ctgtgatttt 19860
 gggcaagtta cttgaattct ctgtgtgtag atagaacaat gttgaggaa atccctttcc 19920

ES 2 762 610 T3

cccatccttg tgtttccaca agggaacttg cttcctaata agtaacactt tcaggggaat 19980
 attctaggcc cttctcttat cccattact tgttctttct gtgaaaagag gagaggtaa 20040
 tctgatggat gaaatcctta atctttcatc ttctggactg tagagcctgt gaaccaaagc 20100
 aatggaccac ttgcaactgaa attgaggctg accctgtatt ttgattctta tttggcaact 20160
 tatttctatt ctgttcccaa ttcaaatcc caaggggaga aggaagataa ttgattacca 20220
 gaagtatgta atggtggtag gaagttgaat aaatggtaac tttttaaag ttgcatgaga 20280
 tatagtcctt atcccagaga agctaagttt gcttttcttt cctctcatgt attttagtat 20340
 tatttctaca attagattgt aaacccttta aaagcaagaa tatttctaca ttttcttact 20400
 cctgatagca cacagtagac tgctgggcac atacatagta ggtggctctg taggtacttg 20460
 ctaaattgatt caacatgttt ttccctcatg gaaaagaaag atttcagtat tgttcttacc 20520
 agctaggaag gcaactctgaa taggaaatca gttctaggca ggtatccata aatgggttat 20580
 gatttccaac ttacttgccc cagaggctcg ctaatgttga actcttcacg ggtactttgt 20640
 cttgcttcat gagctataca tgctaagggg ttagcagatc atataatctt ttgatctaca 20700
 aaatgatgc tttattgaac aaaaacttg gccaaaggcc tttctcctt gccaccttcc 20760
 tccctctttt cattctcttt tttgggaatg ccctttgtgc atgttagtta cagcatgtac 20820
 cacattgcac tgtattggtg gtttttgggt ctaaccacc cttaacactg cagtcccaa 20880
 gggcagaaat tcagttctcat tcattttgat gtctcagtg cctgtgctca gagaatatct 20940
 attatttgaa aaaatagtgc aaaagtaaat ttagggagac tacatcacac tcatctaac 21000
 tgcaagttg acaagttgac atccaaaaga aaggctctcc taataacct cgccacagaa 21060
 atttgggtga cttttgtagc tctggagaaa gcagaggcaa aaatgaaacc taaaaattat 21120
 ttgtgggttt ttaaaaaatg ttttctcatg gagtaaaggt ctacagctga gttcttttca 21180
 tatgagggaa tgacagaaac acagctggtt ctgactttca gtttcaactg agcgaccaga 21240
 gctctgctgg tgaacagga acttgattg tgcccctgac gtgcaccttg aaggtgtcag 21300
 ctcatgtcc ctttgttcac ataaatagtt ttttaagaat tgtttttgat cttgtgagcc 21360
 tctaactaaa tgattaacca tgcaaagttg gccatttggg gtaatactga agcacttctc 21420
 ttgagggcta ttgacaggtg ggaatgtgcc cacctccttg ggtctctggt tttcatgtca 21480
 tacttgcaaa tcagtgacag tttaaacttg gggcaatcac ttagcaagtc tattgagtta 21540
 ccaagttaat tattcccact ttgcatgaag caaccttgaa aatgattttc ctaaagcaaa 21600
 gtacatccaa actcagttac ttcttaataa cttttgctga atgaataaat gactaattca 21660
 taaaaaatgt aacatatctt taattcttac ttacgggcag ttaagcctc ttgtgtaaga 21720
 ggaggcctcg gcttgagata acataggata gtaagcctcc tagagaaatt tctatatgga 21780
 aacatggtct gctatgaagc tagaagtgag aggacattat atttgacat tatatttggc 21840

ES 2 762 610 T3

ttcagagctt ctcaacatgg ggcccaaagt caaggtccct tgtttcatta agaggaggtc 21900
 caggagtgca tgacacccat cagactactg agaccagct ggaactagge accttgcaca 21960
 ggggccttgc ctaatcaaaa tagttcttat tttttctgag ttccaagtaa ctagtctcct 22020
 aaccagtggt ctggatagta gtgccaaagt ggagtacctt caatgaactt cctcatgagg 22080
 ttatttctag cctattggaa tgtttcgttt taggagggtg aggaaggga gtcttgaatt 22140
 tttgtgctta gtttaatggt gtgatacagc tttgaccatc cgtttaatgg gagatctggt 22200
 ttccagatga ctatacatgt ggaaggaga agtttttga gtgtttttt taacccttt 22260
 taaagaatgg ttttccattt agtctctaca tttgggggta aaaggtcctc tagggagact 22320
 tttcaaaagt atttgaagtt tgcactctgat ttcagaggtg agttggaggc ctatctgtgt 22380
 atgacagaca catgtctcca acaactatat gttcacaagg actaagagcc atccttttgg 22440
 gtccatcatt caacattgat ctcacattcg tgttcgtatc agtatcttta cagtgcgctc 22500
 ccagttacat ctccctaatt tcccttagta ggcttcacag aatttgaggt gtatgcaatg 22560
 gcagatgacc acatgtggag tcatttaacc acatcttcca ctgcaagtca gcccgctctt 22620
 gatgtctggt tatgtttaga ttccatcttt tggaaagattt cattcctctg cactatctca 22680
 gtatctcaga tgcttttgag actgggtcct tttccctcc tatgtttggc catggccacc 22740
 ccctcaggggt tgtgttgtgt ttcacagctg ctgtttgtag ggttgacctt tacaatgtac 22800
 aaagctcttt cccatattgt gacaatccct ggtgtgatgc tgtgagttag gcagggtgtg 22860
 tatacgtgtc ctcatcatat tacagtggta aggcaacagg gtttttgaat ttgatcacc 22920
 atgaatttgt ctaatttgtt ggtaaaaaat ggtcatgtat cagccgtttc acagggtcag 22980
 cttaatagaa agtgggagtt aggcaggacc agaattcagg acttcagccc ccggtcccag 23040
 ggactattct ctatacccaa ttgtcccacc ttgaatcagt ttcttctagg gaaatatctc 23100
 caaaactgag atggcaccca caggacttct taattgtagt cattaccagg aaaaacaagc 23160
 aaaggaactg gtgtaaatct ctgtttttgg tgattggtgg agatttgag attgtcttgt 23220
 gtcaaaagta aagccactag attaaatggt ttgttaataa attggttatt ttttaattaa 23280
 ttatttgaca gtttaattac attattcaaa aatcaaaata aaatttaaaa gaagtttaca 23340
 ctgaaaagtc ttgcccact tataccctgc tcacctcagt atcccccaat acataccatc 23400
 tataaggatga tcatttgtat tagtttcttg tgaatccttg atagtgtggt ttatatagat 23460
 acaggtaaat atgagtatgt actattatct cccccccacc ccacctggt ttttttttga 23520
 gacggagtct cgctctgtcg cccaggctgg agtgcagtg cagcatctcg gctcaccgca 23580
 agctccacca ttttcccca tttttaaac aaaaggtagt agccatatat aactatctt 23640
 acaocttgtt ttatcaacta ctaatatata ccagagagct ttccatcatt ttgtacatat 23700

ES 2 762 610 T3

gcacctatat ctgtcaatta ttcccagaag tggaattgct gggtcagcag gaaaaatcat 23760
gtataatfff gataggtatt gcctaattgt cctgcacagc gcttgaattg tttgtactcc 23820
caccttttagt gtatgagaag acctgtttct ccatagcctc atcaaacaga gtgtgtgaga 23880
ttagatgaga aataggaggc gacagctctt ttaccccatc cgtagtttgc agtggaaca 23940
ctgcacagtt gcaagagctg gtgcaggtat cagattagtt ccagtgaaa cgctgcctca 24000
ccatggccat gggcttgccg cagctctagt gacacacagc gaatggacc acgttgccac 24060
ttgcagaatt tcctgtagca gaaagttgaa catgcattca ttattcatct aactagccat 24120
gctggatcta aagagcaca cagtgttttt tagaaccaaa aagaaaattg tttcactaca 24180
acacactgtg tataaggctt tcaatgctct tttctcagct attaacatta ttttcaggac 24240
tgagttcaag agatgtatcc caaatcacag ggatgtcttg ctaagcttgg aactttcata 24300
ctcaagggat gcttttttga ggaatgattt tacacttact caacatttgt aattaaataa 24360
ttagtacttt ataagataaa tttaaactgt ccaagtacaa tataaacatt gaactatgat 24420
gcattattgc tagacttttt ccttaaagtt gccaaagtgt ttcctgcatt aggcaaatag 24480
gggatcatat aaaaatgccg tgatttacgg cctagataac atctccacca tttgagcagc 24540
atatattcca ggtcatcccc acataactcc ttaccattct cattagaaag gttgattctt 24600
agtcttattt ttctctgagg acagcaaaaa aaaaaatccc cttcagttcc actgcataga 24660
aaagtgtggt aatggagcc gggcacagtg gttatttaat ttaaatggac aatatttttt 24720
atagaatfff gacagggcca ctgtataggg gaaagtcact cctcttcccc tttatagaag 24780
agttgcacct ggacagttgc attgatgact gtatccagtc tacacaagag gtcattcctg 24840
ggcataagaa tggactgcca aaatctagct gaaacaccat tgacaaatag acattttctt 24900
ttgttaataa tacctgtgaa ggctttcata acagacattt ccagttttgt tctcaggctc 24960
cttgcagctg ctctctataa agtgtgctct cttccaagag ctgacaatgg ccagaagcaa 25020
gggtttctgt cttttgtgcc atcatcatct aacttgccac acacatttgg gatgtcagcc 25080
taggtatagg ttttgtatcc actcagtatg gcttgtgggt ctggttgcct ttgttattca 25140
tgctgagggc ctctgggcat cagtttgggt tgagagaacc cattccatga cctccttcc 25200
tttggctgtt ttgactcgat ggctcttgtt ggcacagctc gtgagtgct gatgctctat 25260
ccatgccgga ccatctgttc tgcctgctct gtggtctgaa gtcgttttct gaactattcc 25320
ttgataataa atttgagatg atcttgttct acctttcttt tcaagtcaca tcttagcccc 25380
ttagccacat tcccgaagaa catgacaaat ggatgggtca caagtcacgt agcatagggt 25440
gtcagaccac gaggctttga agggattctg ttgggtgcta aaaagaaaga ttttgtgtca 25500
ccacgatttt ttttaaaggc atgttgacac ttaggcctta attgaaagcg ttcttactca 25560
agtagagttg acagaggagt atttggtagt cgcggttgct ggtctgaaga gcatgtggtt 25620

ES 2 762 610 T3

ctgtttcaat gcccaatgag atctttctcac gggaaaatgt tctgacatct caaacaaatg 25680
 accttcatgc atagttttga caaaataccc tattaagtat gcataatgg ttggtacctt 25740
 gtggaataa ttcaatactg gaaacagagt agcaacaaag aaacattagg gttatattta 25800
 acctctgtgg aattagtgtg taaacaaact gcttatcaga aatgctcata tggggctttg 25860
 tttaaataa taagaaactg gcatataggg tctgcaggat atttctgcca agtagacctc 25920
 cctcacatta taagacacca catctatgtc tgaccccata tggaaagagg catagcaagc 25980
 cagcactggt tcatattccc tctccaccac ataatgggta tgtgatctta gggaatccac 26040
 cgaaactctc tgggcctcag tttcctcagc tataaatggg ggataatcaa attatttacc 26100
 tcaccattaa taaatgtag ctattatfff ttatcaagtt taatacaaag agaaacattt 26160
 tacttatttt tccagctatc cagagcatct tccaaaatcc tatcaccaac aaatactgta 26220
 ttgtatttat tatagcaact atgtaaaaat ggagtccttg tcctatgctt agatgaaata 26280
 tgttggattt tgagtttgca tgtcttctat aggaatcagt gtttagtgaa aacgggtgga 26340
 gataaacaga tgttttcaca gtcctgttgt tcacagtacc gccaaattga atgtttccat 26400
 ataggtgcat tctaattggct taaatgatgc agatattttc tggccagcca tatggatctt 26460
 ttgtcatcta agatgttaat attttctcta tattttatag tagttctgga gtacagccag 26520
 tttcttgaat agggctccaca tggctcatta tgcacagggc ctggaaactg ccttactcgt 26580
 gctgttgaaa tgaaccgtga cacttcagaa gagctgggag ctggggtaga gcagtggcta 26640
 ggagaacata ttcaattata tttcctcctg cattaagcta caagtaatga gcactttcct 26700
 gtgctttaca gttaagtaat taaaagaaat tatagagtgg gatgcaaaaa taaccggaag 26760
 gacaactgga tgtgtggagc caccagtttt ctccatgagt gcacaagggt aatccttggt 26820
 actactcaga atgctgagtt tctacagaaa gggttgcagg tccacacatg ttttggcgctc 26880
 taccacacag cttctgtatg gcatgactgt gcatcccaga agaagggctg tgctgtgtac 26940
 ctccacgttt cagtggaatt taacaaactg atccctgaaa atggtttcat aaaggtgagt 27000
 aacagagagc taatagcctt ctcttgctaa ttttatcttt cccccaagat ttcttgataa 27060
 tagtttgaaa aggagtgtta ttctttggtc tctagaggca acttaccttt ccagtttctt 27120
 coatcacctg ttttcatctc tottgttttt ttaaatttaa tgctgtatgt atttcagagg 27180
 ataggatcta atctagtgcg gtcocctcat caggtgagaa ttattcatct cattttcatt 27240
 ttagcccttc tgaattaatg acattgaagc ccggcagttt ggtcctaaga tgggtttaat 27300
 tatgtacaga tactctttct ataatggaaa ttgctcagat aactaattaa ccacaagaat 27360
 aactgtctta tggaaaatft caggagcacc gtctgtggaa aaactgggaa gggcatgctg 27420
 tcaccacagc tctggggtct attaaaagtg tggttatgca gcactgggtg ctagtgggggt 27480

ES 2 762 610 T3

gttggctctc aactgccaga attcccatag catttcatgg cagaaagtca aggtgtccag 27540
 caatactctg aaagtgacct gttgattaaa gtcgtcaatt ctgaagaaag agactgaaat 27600
 aagacaaatg ggtottaact ttttttctct ttctctctct tgtaaaaatg tgtgattggt 27660
 ctggcatggt cccaatcccc acataatgcc aacatctttt cttaaagggg gattcccttt 27720
 atccttgat ctgagaatta ttgcatgttc tccttttagg gacaatgaat gcagttgcat 27780
 cacccttgct tttttttttt tttttgtaca cagcatgctt attccttgat gcagggactt 27840
 gaaagacaaa gccccacctg gctttcacia catctcctat tagtaggtgt gccttgtgtg 27900
 taatttgaag gaggcggtcc cttagctgtg tttacactgt acttttaaact gtggggctga 27960
 aggtagaatc aaccatactt aagatgccac ctgggaaaat agggttctgt gtcactcag 28020
 ccccacccat ttgcaaatga cttaacagca gcaactattag ggttcctagt gtgagtcatt 28080
 tgcatttga ctggtgaact tggtgacttc ttggtgttg gaaacaaaca acctttgcag 28140
 tctttgtaa aaagcctgaa cagtggacca gtctocagtt ctacttgcaa agctgcccc 28200
 atcaaatccc tcataatgtt caacttaaaa aatgttacac tttctctgg aaatctaacc 28260
 ttttttctt ttttaaaagc cattttaagt acttcagtct tgaatcaaat gatoccaaact 28320
 attggacacc aacctagaaa ttgggttacc tcctgggaac tttatcgaag aagagagatt 28380
 ttggttgag agggggtttt gatgtttgat acttatattt actattttaa tatttcattg 28440
 ttggtgtgc tgcctgctgt gtattatttt gcgagtttct tttgtttaaa tttcatggtg 28500
 tttgtagga gagagctgga tctgttggtt tcaggacaag tctagaaata agaaatctgc 28560
 cttgagtgag tgagttggtt ccctctggtg ctatttcacc attaaggacg aaaggaactc 28620
 acaaggacca gagacatctg gctgaaagca atactagtgt gactggacat ctactacctg 28680
 ccatagttgg tcataatcgtt tccagatga ttctgattga gtgagtgata ttaggctatg 28740
 ttcagggatc agggaggcta attatgctta tattgccttg tagcattttg gtaagaatta 28800
 atgattgtgt agatgtccag atttaggtca gcaatattct aaaagttctc attgaaactaa 28860
 tcatgtttat aagtagcctg tactttctat cataataaca atagtggaaa agctagttga 28920
 cataaaagga gccagattt tacttaagta aaaacacaaa agcaaagata ttttccaca 28980
 taaattacaa aagcaaagat attttcccac ataaatgtcc ccataaaaca agttgaacca 29040
 aagaggaaag atgacaggta accgtatgac acgctaagaa agtatcataa tacttaagtt 29100
 aacttcaacc ttttatttcc ttatcctaag cagcctcttt tctctttatc atttagtctc 29160
 gtgcttctca actttgataa gtaaaaaagt tattgcacta aataaatctt attgaaatgc 29220
 aggatctgat tgagtggtg gggtaggtg aatgaggtg gggagttga gattctgcat 29280
 ttcttagaag tttctacttt atgttaaaat ggctaacca tctcaacatt gagaagtaag 29340
 gtttcaetta atttcagcct gtgtaagttt atcccatatg tacatttctt aaaactctaa 29400

ES 2 762 610 T3

tctcaggccc caggaatttc tcctttagtt aaaatatttt taggaataaa tttgaattgc 29460
 attaatacac aatttataaa tttaacacaa aaaattattt gaagtttgag acttttaggtt 29520
 gcatgaaatc aatttcatac ttgaaaattt tctataaatt caaaagtctg tgtatttaaa 29580
 tacaatttaa atacctgtgt tacagtgaca tttgtttttc tgtctctctc tccaccattt 29640
 ccagagtcac catccctgta cagaaaaatt tttcccacat gatttcacca taaattcatt 29700
 aaatatgatg cttacttgat aatttctcca ggttcttttt ttttttaatt atactttaag 29760
 ttctagggta catgtgcaca acctgcaggt ttgttacata tgtatacatg tgccatggtg 29820
 gtgtgctgca cccattaact cgtcatttac attaggtata tctcctaagc ctatccctcc 29880
 cccctacccc tactccatga caggtcccag tgtgtgatgt tccccaccct gtgtccaagt 29940
 gttctcattg ttcagttccc acctatgagt gagaacatgc ggtgtttggt tttctgtcct 30000
 tgggatagtt tgctcagaat gatgtccttg ctactgatg gacatttggg tggctccaag 30060
 tatttgctat tgtaaatagt gccgcaataa acatacgtgt gcatgtgtct ttatagtagc 30120
 atgatttata atcctctggg tatataccca gtaatgggat ggctggctca aatggatttt 30180
 ctagttctag atcctagagg aatgccaca ctgtcttcca caatgtttga actagtttac 30240
 agtcccatca acagtgtaaa agtgttccta tttctctaca tcctttccag cacctgttgt 30300
 ttccggactt taatgatcgc cattctaact ggtgtgagat ggtatctcat tgtggttttg 30360
 atttgcattt ctctgatggc cagtgatgat gagcattttt tcatgtgtct tttggctaca 30420
 taaatgtctt cttttgagaa gtgtctgttc atacccttca cccacttttt gatggggctca 30480
 tttgattttt tcttgtaaat ttgtttaagt tcttttagat tctggatatt agccctttgt 30540
 cagatgggta gattgtaaaa attttctccc attccgtagg tttcctatc actctgatgg 30600
 tagtttcttt tgctgtgcag aagctcttta gtttaattag atcccatttg tcaattttgg 30660
 cttttgttgc cattgctttt ggtgttttag tcatgaagtc cttgtccatg cctatgtcct 30720
 gaatggatt gcctaggttt tcttctaggg tttttatggt tttaggtcta acgtgtaagt 30780
 cttaattca tcttgaatta atttttgtat aagggtgtaa gaagggatcc agtttcagct 30840
 ttctacatat ggctagccag ttttcccagc accatttatt aaatagagaa tcctttcccc 30900
 atttcttgtt tttgtcaggt ttgtcaaaga tcagatgggt gtagatgtgt ggtattgttt 30960
 ctgagggctc tgttctgttc cattggctca tatctctggt ttggtaccag taccatgctg 31020
 ttttggttac tgtagccttg taatatagtt tgaagtcagg tagcgtgatg cctccagctt 31080
 tgttcttttg gtttaggatt gtcttggcga tgcgggctct tttttggttc catatgaact 31140
 ttaaagtagt tttttccaa ttctgtggag aaagtcattg gtagcttgat ggggatggca 31200
 ttgaatctat aaattacctt gggtagtatg gccattttca tgatattgat tcttctacc 31260

ES 2 762 610 T3

catgagaatg gaatgttctt ccatttgttt gcgtcctctt ttatttcctt gagcagtggg 31320
 ttgtagttct ccttgaagag gtcttocaca tcocttgtaa gttggattcc taagtatttt 31380
 attctctttg aaacaattgt gaatgggagt tcaactcatga tttggctctc tgtttgtctg 31440
 ttattggtgt ataggaatgc ttgtgatttt tgcacattga ttttztatcc tgagactttg 31500
 ctgaagtgc ttatcagctt aaggagattt tgggctgaga tgatgggggt ttctaaatat 31560
 acaatcatgt catctgcaaa cagagacaat ttgacttcct ctcttcctat ttgaatatcc 31620
 tttatttctt tctattgcct gattgocctg gctagaacgt ccaatactat gttgaatagg 31680
 agtggtgaca gaggacatcc ttgttttgtg ccagttttca aagggaatgc ttccagcttt 31740
 tgcccattca gtatgacatt ggctgtgggt ttgtcgtgaa tagctcttat tattttgaga 31800
 tatgtcccat caatacctag tttatttaga gtttttagca caaaggctgt tgaattttgt 31860
 caaaggcctt ttctgcatct attgagataa tcatggtttt tgtctttgat tctgtttata 31920
 tgatgatta tatttattga ttgcatatg ttgaaccagc cttgcatccc agggatgaag 31980
 ccaacttgat catggtggat aagctttttg atgttctgct ggattcgggt tgccagtatt 32040
 ttactgagga ttttccatc gatcttcac agggatattg gcctgaaatt ctctttttt 32100
 gttgtgtctc tgtcaggctg tggtatcagg atgatgctgg cctcataaaa tgagttaggg 32160
 aggattccct cttttctat tgattagaat agtttcagaa tggtagcagc tcctccttat 32220
 acctctggta gaattcagct gtgaatccat ctggtcctga tggatttttt tggttggtag 32280
 gctattaatt attgcctcaa ttcagagcc tgttattgggt ctattaagag attcaacttc 32340
 ttctctggtt agtcctggga ggggtgtgtgt gtocaggaat ttataaattt cttttagggt 32400
 ttctagttta tttgcataga agtgtttata gtgttctctg atggtagttt gtatttctgt 32460
 gggattgggt gtgatatccc ctttatcacc ttttattgca tctatttgat tcttttctct 32520
 tttctctttt attagtcttg ctagtgatct atcaattttg ttgatctttt taaaaacca 32580
 gctcctgggt tcattgattt tttgaaggag tttttctgtc tctatctcct tcagttctac 32640
 tctgatctta gttatttctt gtcttctgct agcttttgaa tgtgtttgct cttgcttctc 32700
 taaattgtga tgttaggggt tcaatttttag atctttcctg ctttctcttg tgggcattta 32760
 gtgctataaa tttccctcta cacactgctt taaatgtgtc ccagagattc tggtagttg 32820
 tgtctttggt ctattgggt tcaaagaaca tctttatttc tgccttcact tegttaagta 32880
 cccagtagtc actcaggagc aggttgctca gtttccatgt agttgagtgg ttctgagtga 32940
 gtttcttaat cctgagttct agtttgaag cactgtagtc tgagaggcag tttgttataa 33000
 tttctgttct tttacatttg ctgaggagtg ctttacttcc aactatgtag tcaatttttg 33060
 gaataagtgt gatgtgggtc cgagaagaat gtatattctg ttgatttggg gtggagagtt 33120
 ctgtagatgt ctattaggtc cgcttgggtc agagctgagt tcaatttctg gatattcttg 33180

ES 2 762 610 T3

ttaat1111ct gtctt1111ga tctgtctaat attgaccgtg g1111gataaa gtctcccatt 33240
 attatt1111gt g1111gagtctaa gtctctt1111gt aggtctctaa g1111gactt1111gctt t1111gtgaatctg 33300
 gtgctcctgt attag1111gca tatatt1111tta ggatag1111tag ctcttctt1111gt t1111gaatt1111gatc 33360
 cctttatcat tat1111gtaat1111gg ccttctt1111gt ctctt1111tgat cttt1111gtt1111ggt t1111aaagtctg 33420
 ttttatcaga gactag1111gatt gcaactcctg cttt1111ttt1111tg ctttccattt cctt1111ggtaga 33480
 tcttccctca tccctt1111tatt ttgagcctat gtgcgtctct gcacatgaga t1111gggtctgct 33540
 gaatacagca cact1111gat1111ggg tctt1111gactct ttatccaatt t1111gccagtcca t1111gtctt1111taa 33600
 ctggagcatt tagccattt acatt1111taagg t1111aatatt1111gt tat1111gtgt1111gaa ttt1111gatcctg 33660
 tcattatgat gttagct1111ggt tattt1111tgctc gttag1111ttgat gcagtttctt cctagcctca 33720
 atgatctt1111ta caattt1111ggca t1111gtttt1111tgca gt1111ggct1111ggt1111ta ct1111ggtt1111gttc ctttccat1111gt 33780
 ttagt1111gcttc cttcag1111gagc tctt1111gtaagg cag1111gctt1111ggt g1111gtgacaaaa tctctcagca 33840
 tttgctt1111gtc t1111gtaaaggat tttatttctc cttcactt1111at gaagcttagt tt1111ggct1111ggat 33900
 atgaaattct g1111ggtt1111gaaaa ttctt1111tctt taagaat1111ggt gaatatt1111ggc cccactctc 33960
 ttct1111ggctt1111g tagagtttct gcc1111gaaagat gct1111gttagtc tgat1111ggactt ccctt1111gt1111gg 34020
 gtaacctgcc ctttctctc cgctgcactt aat1111gtttt cttcattt1111c aactt1111gg1111tg 34080
 aatctgacaa ttat1111gtgtct ttgagttact cttctt1111gagg agtatctt1111g c1111ggcattctc 34140
 t1111gtatttct gaattt1111gaa1111t gct1111ggcctgc ctcactagat t1111ggggaagtt ctctctgata 34200
 atatcctgca gagc1111gtt1111tc caactt1111ggtt ccattctccc catcactt1111c aggtacacca 34260
 atcagat1111gta gattt1111ggtct tttcacatag tcccatattt ctt1111ggaggct tt1111gttcattt 34320
 cttt1111tactc tttt1111tctct aaacttctct tctt1111gcttca tttcattcat tt1111gatcttca 34380
 atcccttctc tccactt1111gat t1111gaa1111tcagct act1111gaa1111gctt gtgcatt1111gtgt cacatagttc 34440
 t1111gtgccatg gttt1111tcagct ccactcag1111gtc att1111taagg1111tc ttctctatgc t1111gtttt1111tct 34500
 agttagccat t1111gtctaatg tttt1111tcaag gttt1111tagct tctt1111tgctaa aag1111gttcaaaa 34560
 catcctcctt tagctc1111ggag gagttt1111gtta ttact1111gatca tct1111gaa1111gctt tcttctctca 34620
 actt1111gtgaaa gtcattctct gtcacagctt gttccatt1111gc t1111ggc1111gaggag ctgcattcct 34680
 tt1111ggaggaga agac1111gtgctc tgattt1111tag aattt1111tcagc ttctctgctc t1111ggtttctcc 34740
 ccatcttatt g1111gtttt1111tct acctt1111gg1111tc ttt1111gat1111gatg gtgac1111gtaca gat1111ggg1111gtt 34800
 t1111gggt1111ggat gttctt1111tctc ttt1111gttagtt ttccttctaa cagtcag1111gac cctcagctgc 34860
 aggtctg1111tg gagttt1111gctg gaggtccact ccagaccctg ttt1111gctt1111ggg tatcaccagc 34920
 agaggctgca gaacagcaaa tatt1111gcagaa c1111ggcaaat1111gt tgctccctga tt1111gttctct 34980
 g1111gaa1111gctt1111gc tctcagag1111gg gcacct1111ggcc g1111tat1111gag1111gt t1111cagtc1111ggcc cctact1111ggga 35040

ES 2 762 610 T3

ggtgcctccc agttaggcta ctcaggggctc aggaaccac ttgaagaggc agactgtcca 35100
 ttctcagata tcatattcca tgctgggagg acccctactc ttttcaaagc tgtcagacag 35160
 ggacatttaa gtctgcagaa gtttctgctg tcttttgctc agctgtgcc tgcccctaga 35220
 ggtggagtct acagaggcag gcaggcctcc ttgagctgcg gtgggctcca cccatttoga 35280
 gcttctggc tgctttggtt acctactcaa gtctcagcaa tgggtggacac ccctcccca 35340
 gcctogctgc tgctttgcag ttogatctca gactgctgtg ctagcagtga gccaggctcc 35400
 gtgggcatgg gaccctccga gccaggcctg ggacataatc tcctggtgtg ccgtttgcta 35460
 agaccattgg aaaagcacag tattaggggtg gggagtgtcc tgattttcca ggtaccgtca 35520
 gtcattggctt cccttggtca gaaagggaa tcccccaacc ccttgtgctt cctgggtgag 35580
 gtgatgcccc accctgcttt ggotcatgct ccgtgggttg taccactgt ctgacaagcc 35640
 ccagtgagat gaaccogga cctcagttgg aaatgcagaa atcaccogtc ttctgcatca 35700
 ctcaogctgg gggctgtaga ctggagctgt tcatatttgg ccatcttga acctccctt 35760
 ccaagttctt tattacagag tgggtcactg aaacttcagt gaacaaattg gaaattatct 35820
 tcttaattaa tgtcactgtc taccatgtat ggaatttgg taaatattat atggtttcaa 35880
 taacatagta gatagaacat tgtcaaatct aaacttcagt gaattgtaac agatcccacc 35940
 tgaaattcta aagaaaacag aattctaatt gaagaggta aacttttaca ggaatgtca 36000
 actgccattt gggctctgta aacaaaaaac tgttttttaa aaaagtaaac tttaaaagta 36060
 ttttcagatg acctcatttg ctatccaagt ggcttgagta tgcttgatgc taagacttct 36120
 ttgttacaga ctggagatgt gtgctactgg ggcagtgttg ctctgtgaca aggaggcaga 36180
 ggatgagggc aaggttogat gtgactgtga attctgggtg gctctggcta tcgggagcct 36240
 tcattgatta cagcaaaaca gtgctttcc tagggcaata gtgtctctgt caccaggct 36300
 ggagtccagt ggcattgatca atogctcact gttagcctcaa cttcttagac tcaagtaac 36360
 ctcccacctc agcotccaa gttagctgaaa ctacaggtgt gcaccaccac acctaatctt 36420
 tttaattttt aagtttttgt agagacatgg tctcactgtg ttgccaggt tgatctogaa 36480
 ttctgggct ctagtgatcc tccgcctcg gcctcccaa gtgttgggat tacaatgtg 36540
 agccactgca cctggcctt tgcaacctc ttgacaatgc attccttat tcctaaactg 36600
 gaagtaactt cttctcttt ataaaattgt atctgtacct tttctgggtc attctacct 36660
 ttatattcta gttacgtatg tcctacctc ctctagga gggaggtgag taagactgga 36720
 aagtagactt catgtgtgat gaatgaatga acaaaaggaa gtctaacata tggatagat 36780
 caactggatg caaattaaat atttttaaatt attgatttgc aagatttcat taaggtcaac 36840
 tcttaatagt ttgtatcata tatgttagga accaaatatt aataacttct tcagcattac 36900
 cattatcttt ataggactgt ctaaaatgag cagccatctc tttaaactgt gttttctctg 36960

ES 2 762 610 T3

attacacgct cacaggtaaa acccaaaggg gctgggaaca aacaagactt tttttttttt 37020
 ctgtatgcct gaattatctg tactgttgct tgttttccca cttttggcca tagaaactta 37080
 gttctaacat gctacaatth ttgcagttct ttctcttaga aaaagaccac attgtctgaa 37140
 atttcatcca ttttaagtaat caagccttaa agttgaagga tcttggtcat gattaatcta 37200
 gacctacaaa gtagtatctt aatggcactc cttttagaaa gttaggttcc aggacacaca 37260
 tagctgcagt gtccacatth tgtaagctcc ttogttgtca cagccactct cttctctgtg 37320
 gctgatattc taaaactggc aacacatcct gatggtaaaa gcttggttca ggagacaggt 37380
 gacctactag ctttatggca tttgacaggt tacctaacct ctctgacgca taattgcctc 37440
 atctatataa tggggataat aataccctc ctgtctcctt gtaaaaatca aattagatga 37500
 cgctgtgaa tgttctatag tctcttagac aaatgtaagt tatgactaca gcaagagtaa 37560
 aagagcatgt tgttatggac attctttcag tgaatgtct aagacttgtg agtcacactt 37620
 aaagctaaac ttgatctcta cttcattgat tttcttttta gttctatgta ctatattgaa 37680
 tttcctgaca gtggggctat gaaagccttc ctagcatttt atagatgtgg ttgaattaat 37740
 ggctgtaagc cttaaagcag aattagacag catcaatgaa tttattaagt ataaataaat 37800
 atataatctg cttagcaata ttacacagcc tctttatctt atgtgtgata aagagtcctc 37860
 cgaaggttga aatgaagaa ttgtcctgga agctcttact taatctttta ttatttocta 37920
 atacagtata taaaattact cattgaaagc ttagcagaat aagaacaag aagttaaaag 37980
 gctgaaaact acaaattttg ctattattat tgttattact tccaagtct cttattgatc 38040
 tgttagaaat agagctacac aggaaattgt aggacagtta gtatgtggta gtgttatctg 38100
 ctttttaatt attcaagtaa ggttttattc cattagagga actcaagaag ttggtcatgg 38160
 ctgataaattg ctatctgtca aattccttag agcagggatc cgcaacaccc aggccatgga 38220
 ttgttaccag tccttgccct gttaggaacc aggctgcaca gtaggaagtg agcggcgggt 38280
 gagcaaacat tgccatctga gctctgtctc ctttcagatc agcagcagca ttagattctc 38340
 atagaagcat gagecctggt gtgaactgca catgcaaggg atctaggttg tgtgctcctt 38400
 atgagaatcc aattccttat gataatttaa ctgatgatct aaggtggaac catttcatcc 38460
 caaaaccatc cacctgcta ctcccagacc gtggaaaaat tgtcttcac aaaactgggt 38520
 cctgctgcca aaaaggttgg gaccactgoc ttagagttta taatttgggg ttagcacagc 38580
 ctatatttac ctgagaatth caatgggttc actgatctth ccaaatgaaa aggcttotta 38640
 cgaaaattat atccaaactg tcttttctct tagtttaata aacctatcag taagttttta 38700
 ctgagtactg ctattacatt tttctctgtt aagcattatg ggggctcaga catgatocat 38760
 tcctcaaag aacttacctt tcagctgaag actgactaga atgagcaaat acggttaaca 38820

ES 2 762 610 T3

attaacaagt gagtaggcca gctcggccaa catggtgaaa ccctgtctct actaaaaata 38880
 caaaaattag cggggcatgg tgggtggcgc ctgtaatccc agctacctcc tgctgaggca 38940
 ggagaattgc ttgaaccag gaggtggaga ttgcagtgag ccgagattgc accattgcac 39000
 tccagcctgg gcgacagagc aagactctgt cttgggaaaa aaacaaaaca aaacaagtga 39060
 gaagggaatc aagtactacg taagatgtaa tgtggaatth tagggaagga aggcagtgt 39120
 tgctggagta attagagaaa ggggcatgca tgatttgatg cttgaactgg atcatgaagg 39180
 ataagcaaga ttttggcagc aagtgagagg gagagaggag tttgtcagag gaatggaaca 39240
 agtcaggagg cagtaatgtg tacggcactc caaggactct gtcctgatcg gagcagaagt 39300
 gatgaagcat tgagtagtht gagaaagtha gctaagaagg gtgagggcag atgthtgaga 39360
 gagthtgagta tcagagagaa gacattagat ttgagcagat agaacaaaaa tgccattgcc 39420
 agthththtg taagagaata gtattagggth gthtaccag gaagthgthca tcagagthga 39480
 atggagcaga aagagthgth gatacagcat cgggacgthg thgtcacaaa atgagthgth 39540
 gagggctgag ccaagatgth ggcagthgga thgataaaaa gggatggcca ggacaaatath 39600
 thtaaggaa aaattaacag gacaththta ctgactgthg thggaaggtha thcaggaath 39660
 atathgthca actthgathc aggaththcath thctatgthc thgthgthcath aaathcagth 39720
 gaaccathgth thgaaaagth aggagathacc actgththca caaaaagthath thgaththgth 39780
 gthgthcathc thtaactthca aggctthcath agthgathgath cagthgathth gaathgthgath 39840
 agthgthcathc agagagcagth gctthgcaath thgggthgthgath ththgthcathc athgthgthath 39900
 thctathathc ththgathgth thcagctthgath ggaathcathc thgththgthgth thcagathgath 39960
 agcathgthath thththctath gathgthcath thctctctgath aathaththgth cathgthathgth 40020
 agathathcath athathagth thathathth thctcathath gthathathath aathagathath 40080
 athcathgath ggcagathath actathagthc athgathathath aathgthathca thcathagathc 40140
 cathctathgath thgthgthath caathathath thcathacagth thathathgthc thcathathth 40200
 gthaccathth thagthgthath gthgthgthcath thgthathath thgthathathc thathgthcath 40260
 thathctthth thththththth thgathgthgath gththcathct gthcathcagth gthgthcathth 40320
 thgththctth gthgathathath aathgthgath ththcathath athgthathctth agaththgath 40380
 aathathgth thathathath gthgathcath gathagthctth accathgthgath thgthathgthc 40440
 thathgthathc caththgthath aactththath gathcathathath agathgthgthc ththgthgthgth 40500
 ththaththgth actgthgathath thagthgathath gctthththcath thcathgthgath agthathathc 40560
 accathathath gathathcath thgathgathct aththctthgath thgthathgath thcathathath 40620
 thcathathath thaththgthath gthgathathath cathctgthath thaththathcath cathththcath 40680
 thctathathc thathathath thgathathath gaththctath gathgththgth thathctgthcath 40740

ES 2 762 610 T3

aagtgagagt aaatctaaaa gaaatTTTTT tgtgtgttta gggatggtaa taaagtctct 40800
tagtggttga aaatggtatt tcttcaaaaa gtggagaaca tttgcttttc aataccagag 40860
ttttcagcca tttctgcatt ctgacctatt gactggaggt aggttgcctt tgaattcagt 40920
aaaacttcat gggcagaaac acagttcctt ttctactta tttggatata atgatggcca 40980
ttgcatgtat gtgtcttttt gtaagtccat gcctcagaac tgagaagtag gaataaaatt 41040
agggtcaggg ctggggatgc tactctttgc tgctgagaaa cacaatgctt caggtaagtg 41100
attctgaagt ccttcaccac ctgacggtaa ccttgggttg gtccataggt atgttttcat 41160
tttgcttggt catccatttt aattggcttc ctagagcatg cttgtagatg tagagccaaa 41220
tttagagtag agcaaccctc tggcaaacag gaagagatta attttgtggt atgcttttaa 41280
gggacttccc aggaaacttc aaaagcagaa aaagaagcac tagctgccta ttccaaaatg 41340
tgtaaaacac cactcagctt tttaaaagta ggataaactc agagcgcgcg cacacgcgcg 41400
cgcgcacaca cacacacaca cacagagaga acatctctag taaaaagaaa agttgagctt 41460
tcttagctag atgtgtgtat tagccagaaa aagccaagga gtgaagggtt ttagagaact 41520
ggaggagata aagtggagtc tgcataatggg aggcatttga aatggactta aatgtctttt 41580
taatgctgac tttttcagtt ttctccttac cagacacatt gttttcatga cattagcccc 41640
aggcatagac acatcattaa aatgaacatg tcaaaaaatg atttctgttt agaaataagc 41700
aaaacatttt cagttgtgac caccaggtg tagaataaag aacagtggaa ttgggagccc 41760
tgagttctaa cataaacttt cttcatgaca taaggcaagt cttctatggc ctttggtttc 41820
cttacctgta aaacaggatg gctcaatgaa attatctttc ttctttgcta taatagagta 41880
tctctgtggg aagaggaaaa aaaaagtcaa tttaaaggct ccttatagtt ccccaactgc 41940
tgttttattg tgctattcat gcctagacat cacatagcta gaaaggcca tcagaccctt 42000
caggccactg ctgttctgt cacacattcc tgcaaaggac catggtgcta acttgaaaaa 42060
aattactatt aattacactt gcagttgttg cttagtaaca tttatgattt tgtgtttctc 42120
gtgacagcat gagcagagat cattaanaat taaacttaca aagctgctaa agtgggaaga 42180
aggagaactt gaagccacaa tttttgcact tgcttagaag ccatctaata tcaggtttat 42240
atgctagatc ttgggggaaa cactgcatgt ctctggttta tattaacca catacagcac 42300
actactgaca ctgatttgtg tctggtgcag ctggagttta tcaccaagac ataaaaaac 42360
cttgaccctg cagaatggcc tggaattaca atcagatggg ccacatggca tcccggtgaa 42420
agaagccctt aaccagtttt ctgtcttgtt ttctctttct cctacagtt ccaccaggtg 42480
agaagagtga tgaccatcct tttccttact atggttattt catactttgg ttgcatgaag 42540
gctgccccca tgaaagaagc aaacatccga ggacaagggtg gcttggccta cccaggtgtg 42600

ES 2 762 610 T3

cggacccatg ggactctgga gagcgtgaat gggcccaagg caggttcaag aggcttgaca 42660
 tcattggctg acactttcga acacgtgata gaagagctgt tggatgagga ccagaaagtt 42720
 cggcccaatg aagaaaacaa taaggacgca gacttgtaca cgtccagggt gatgctcagt 42780
 agtcaagtgc ctttggagcc tcctctctc tttctgctgg aggaatacaa aaattaccta 42840
 gatgctgcaa acatgtccat gagggcccg cgcactctg accctgccc cagagggag 42900
 ctgagcgtgt gtgacagtat tagtgagtgg gtaacggcag cagacaaaa gactgcagt 42960
 gacatgtcgg gcgggacggc cacagtcctt gaaaaggtcc ctgtatcaaa aggccaactg 43020
 aagcaatact tctacgagac caagtgcaat cccatgggtt acacaaaaga aggctgcagg 43080
 ggcatagaca aaaggcattg gaactcccag tgccgaacta cccagtcgta cgtgcccggc 43140
 cttaccatgg atagcaaaaa gagaattggc tggcgattca taaggataga cacttctgt 43200
 gtatgtacat tgaccattaa aaggggaaga tagtggattt atgttgata gattagatta 43260
 tattgagaca aaaattatct atttgtatat atacataaca gggtaaatta ttcagttaag 43320
 aaaaaataa ttttatgaac tgcattgata aatgaagttt atacagtaca gtggttctac 43380
 aatctattta ttggacatgt ccatgaccag aagggaaaca gtcatttgcg cacaacttaa 43440
 aaagtctgca ttacattcct tgataatggt gtggtttggt gccgttgcca agaactgaaa 43500
 acataaaaag ttaaaaaaaa taataaattg catgctgctt taattgtgaa ttgataataa 43560
 actgtcctct ttcagaaaac agaaaaaaaa cacacacaca cacaacaaaa atttgaacca 43620
 aaacattccg tttacatttt agacagtaag tatcttcggt cttgttagta ctatatctgt 43680
 tttactgctt ttaacttctg atagcgttgg aattaaaca atgtcaaggt gctgttgca 43740
 ttgctttact ggcttagggg atgggggatg ggggtatat tttgtttgt tttgtgttt 43800
 ttttcgttt gtttgtttt ttttttagtt cccacagga gtagagatgg ggaaagaatt 43860
 cctacaatat atattctggc tgataaaaga tacatttcta tgttgaag atgtttgcaa 43920
 tatcgatcag atgactagaa agtgaataaa aattaaggca actgaacaaa aaaatgetca 43980
 cactccacat cccgtgatgc acctcccagg ccccgctcat tctttggcg ttggtcagag 44040
 taagctgctt ttgacggaag gacctatggt tgctcagaac acattcttc cccccctccc 44100
 cctctggtct cctctttggt ttgttttaag gaagaaaaat cagttgcgct tctgaaata 44160
 ttttaccact gctgtgaaca agtgaacaca ttgtgtcaca tcatgacact cgtataagca 44220
 tggagaacag tgattttttt ttagaacaga aaacaacaaa aaataacccc aaaatgaaga 44280
 ttatttttta tgaggagtga acatttgggt aatcatggc taagcttaa aaaaactcat 44340
 ggtgaggctt aacaatgtct tgtaagcaaa aggtagagcc ctgtatcaac ccagaaacac 44400
 ctagatcaga acaggaatcc acattgccag tgacatgaga ctgaacagcc aatggaggc 44460
 tatgtggagt tggcattgca tttaccggca gtgcgggagg aatttctgag tggccatccc 44520

ES 2 762 610 T3

aaggcttagg tggaggtggg gcatggtatt tgagacattc caaaacgaag gcctctgaag 44580
gaccttcag aggtggctct ggaatgacat gtgtcaagct gcttggacct cgtgctttaa 44640
gtgcctacat tatctaactg tgctcaagag gttctcgact ggaggaccac actcaagccg 44700
acttatgccc accatcccac ctctggataa ttttgcataa aattggatta gcctggagca 44760
ggttgggagc caaatgtggc atttgtgatc atgagattga tgcaatgaga tagaagatgt 44820
ttgctacctg aacacttatt gctttgaaac tagacttgag gaaaccaggg tttatctttt 44880
gagaactttt ggtaagggaa aagggaaacag gaaaagaaac cccaaactca ggccgaatga 44940
tcaaggggac ccatagggaa tcttgtccag agacaagact tcgggaaggt gtctggacat 45000
tcagaacacc aagacttgaa ggtgccttgc tcaatggaag aggccaggac agagctgaca 45060
aaatthtct ccccagtgaa ggccacagca accttctgcc catcctgtct gttcatggag 45120
agggctcctg cctcacctct gccattttgg gttaggagaa gtcaagttgg gagcctgaaa 45180
tagtggttct tggaaaaatg gatccccagt gaaaactaga gctctaagcc cattcagccc 45240
atthcacacc tgaaaaatgt agtgatcacc acttggacca gcaccttaa gtatcagaaa 45300
gccccaaaca attgctgcat cttagtaggg tgagggataa gcaaaagagg atgttcacca 45360
taaccagga atgaagatac catcagcaaa gaatttcaat ttgttcagtc tttcatttag 45420
agctagtctt tcacagtacc atctgaatac ctctttgaaa gaaggaagac tttacgtagt 45480
gtagatttgt tttgtgttgt ttgaaaatat tatctttgta attatthtta atatgtaagg 45540
aatgcttggg atatctgctg tatgtcaact ttatgcagct tccttttgag ggacaaatth 45600
aaaaaaaaca acccccatc acaaaactta aggattgcaa gggccagatc tgthaagtgg 45660
tttcatagga gacacatcca gcaattgtgt ggtcagtgcc tcttttacc aataagatac 45720
atcacagtca catgcttgat ggtttatgtt gacctaagat ttatthtgtt aaaatctctc 45780
tctgttgtgt tcgttcttgt tctgtthtgt tttgtthttt aaagtcttgc tgtggtctct 45840
ttgtggcaga agtgthtcat gcatggcagc aggcctgttg cthttttatg gcgattccca 45900
ttgaaaatgt aagtaaatgt ctgtggcctt gttctctcta tggtaaatg atthattcacc 45960
atgtaaaaaca aaaaaaata tttattgtat tttagtatat ttatataatt atgtthattga 46020
aaaaaattgg cattaaaaact taaccgcatc agaagcctat tgtaaataca agthctatth 46080
aagtgtacta attaacatat aatatatgtt ttaaatatag aatthttaat gthtttaaat 46140
atthtttcaa agtacataa 46159

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) para su uso como un compuesto terapéutico, donde el oligonucleótido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de nucleótidos que se establece en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que conserva la función del transcrito antisentido natural de la SEQ ID NO: 2.
2. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), para su uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociada al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de nucleótidos que se establece en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que conserva la función del transcrito antisentido natural de la SEQ ID NO: 2, donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad o trastorno neuro-otológico, sordera parcial, síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Huntington, lesión de la médula espinal, depresión, deterioro cognitivo, un trastorno bipolar, síndrome de WAGR y obesidad.
3. Uso de un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado al factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde dicho oligonucleótido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de nucleótidos que se establece en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que conserva la función del transcrito antisentido natural de la SEQ ID NO: 2, donde la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en enfermedad o trastorno neuro-otológico, sordera parcial, síndrome de Rett, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, enfermedad de Huntington, lesión de la médula espinal, depresión, deterioro cognitivo, un trastorno bipolar, síndrome de WAGR y obesidad.
4. Un método *in vitro* de aumento de la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en células o tejidos de paciente que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF),; aumentando así la expresión de un gen factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de nucleótidos que se establece en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que conserva la función del transcrito antisentido natural de la SEQ ID NO: 2.
5. El uso según la reivindicación 3, o el oligonucleótido para su uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o el procedimiento según la reivindicación 4, donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de ácido nucleico que se expone en SEQ ID NO: 2.
6. El uso según la reivindicación 3 o la reivindicación 5, o el oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5, o el procedimiento según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, donde el oligonucleótido es monocatenario, o donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
7. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 o 6, o el oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6, o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el oligonucleótido antisentido comprende una de SEQ ID NOs: 3, 5, 6, 7 u 8.
8. Un oligonucleótido que se dirige a un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el oligonucleótido aumenta la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), donde el transcrito antisentido natural tiene la secuencia de nucleótidos que se establece en la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma que conserva la función del transcrito antisentido natural de la SEQ ID NO: 2, donde el oligonucleótido es un compuesto de siRNA.
9. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 5 a 7, o el oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 5 a 7, o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, o el oligonucleótido según la reivindicación 8, donde el oligonucleótido tiene una longitud entre 10 y 30 nucleótidos.
10. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 7 o 9, o el oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 7, o 9, o el procedimiento según una cualquiera de las

reivindicaciones 4 a 7 o 9, o el oligonucleótido según la reivindicación 8, donde el oligonucleótido tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con un complemento de un transcrito antisentido natural de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF).

11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 7, 9 o 10, o el oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 7, 9 o 10, o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, 9 o 10 o el oligonucleótido según la reivindicación 8, donde el oligonucleótido incrementa la expresión de un factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) en al menos el 10 %.

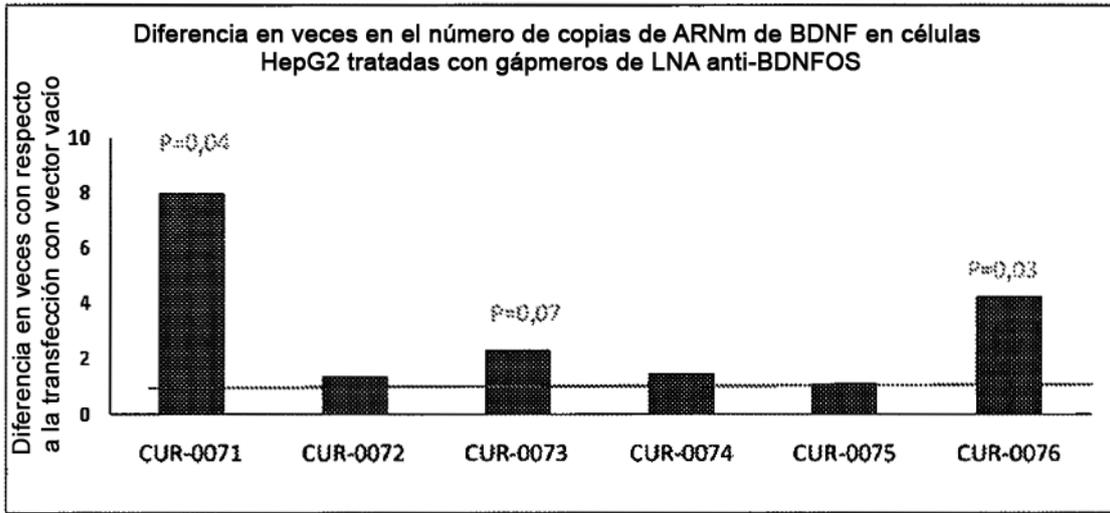
12. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3, 5 a 7, o 9 a 11, o el oligonucleótido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 7, o 9 a 11, o el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, o 9 a 11, o el oligonucleótido según la reivindicación 8, donde el oligonucleótido comprende además una o más modificaciones que comprenden:

- 15 a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
- b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido arabino-nucleico un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
- 20 c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado por 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado por 2'-flúor, un resto de azúcar modificado por 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado por 2'-O-alquilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.
- d.

13. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

FIGURA 1

A



B

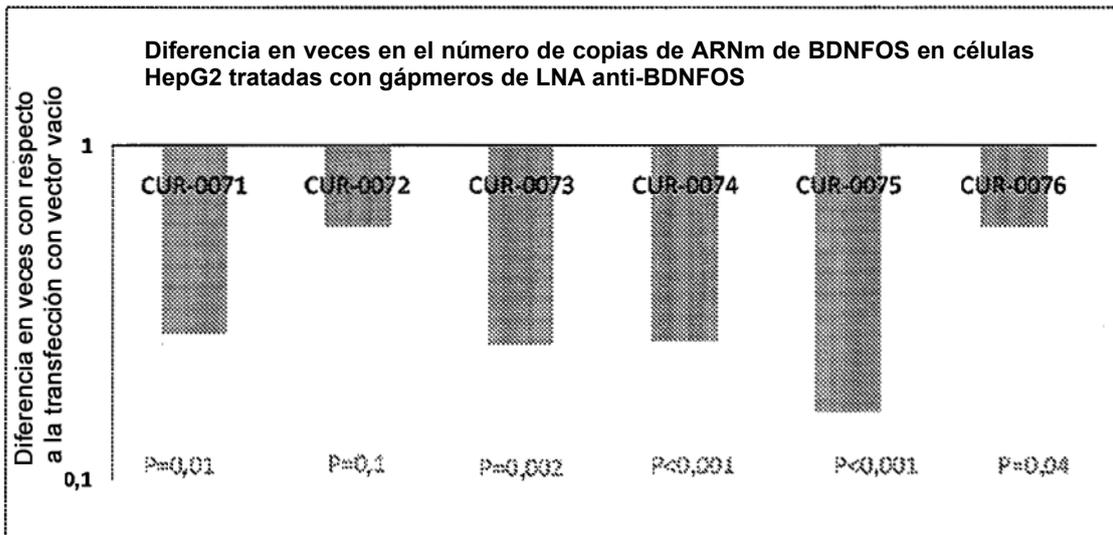


FIGURA 1 (cont.)

C

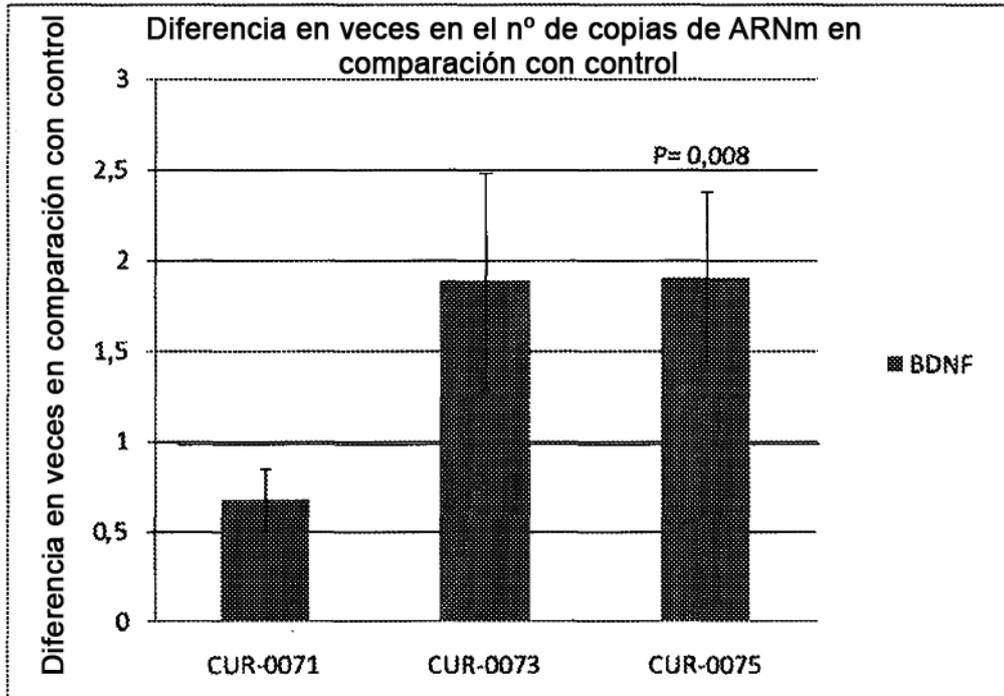


FIGURA 2

(SEQ ID NO: 1)

>gi | 219842286 | ref | NM_170735 | Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) de Homo sapiens, variante 1 de transcrito, ARNm

CACACACACACACACACAGAGAACAATCTCTAGTAAAAAGAAAAGTTGAGCTTCTTAGCTAGATGTGTGATT
 AGCCAGAAAAAGCCAAGGAGTGAAGGGTTTTAGAGAAGCTGGAGGAGATAAAGTGGAGTCTGCATATGGGAGGCATTT
 GAAATGGACTTAAATGCTTTTTAATGCTGACTTTTTAGTTTTCTCCTTACCAGACACATGTTTTTCATGACATTA
 GCCCCAGGCATAGACACATCATTTAAATGAACATGTCAAAAAATGATTTCTGTTTAGAAAATAAGCAAAACATTTTCA
 GTTGTGACCACCCAGGTGTAGAATAAAGAACAGTGGAAATGGGAGCCCTGAGTTCTAACATAAACTTTCTTCATGAC
 ATAAGGCAAGTCTTCTATGGCCTTTGGTTTCCTTACCTGTAAAACAGGATGGCTCAATGAAATATCTTTCTCTTT
 GCTATAATAGAGTATCTCTGTGGGAAGAGGAAAAAAAAGTCAATTTAAAGGCTCCTTATAGTTCCCAACTGCTGT
 TTTATTTGTGCTATTCATGCCATGACATGACATGCTAGAAAAGGCCATCAGACCCCTCAGGCCACTGCTGTTCTCTGT
 CACACATTTCTGCAAAGGACCATGTTGCTAACTTGAAAAAAATTAATTAATTACACTTGCAGTTGTTGCTTAGTA
 ACATTTATGATTTTGTGTTTTCTCGTGACAGCATGAGCAGAGATCATTAAAAATTAACCTTACAAAGCTGCTAAAGTG
 GGAAGAAGGAGAACTTGAAGCCACAATTTTTGCACTTGCTTAGAAGCCATCTAATCTCAGGTTATATGCTAGATCTT
 GGGGCAAACACTGCATGCTCTGGTTTTATTAACCACATACAGCACACTACTGACACTGATTTGTGCTGGTGC
 AGCTGGAGTTTATCACAAGACATAAAAAACCTTGACCCTGCAGAAATGGCCTGGAATACAATCAGATGGGCCACA
 TGGCATCCCGGTGAAAGAAAGCCCTAACAGTTTTCTGTCTTGTCTGTTTTCTCCTTACAGTTCCACCAGGTGAG
 AAGAGTGATGACCATCTTTTCTTACTATGGTTATTTTACACTTTGGTTGCTGAAGGCTGCCCCCATGAAAGAAG
 CAAACATCCGAGGACAAGGTGGCTTGGCTTACCAGGTGTGCGGACCCATGGGACTCTGGAGAGCGTGAATGGGCC
 AAGGCAAGTTTCAAGAGGCTTGCATCATTGGCTGACACTTTTCAACACGATGATAGAAGAGCTGTTGGATGAGGACCA
 GAAAGTTCCGCCCAATGAAGAAAAAATAAAGGACGCAGACTTGTACACGTCAGGTTGATGCTCAGTAGTCAAGTGC
 CTTTGGAGCCTCTCTCTCTTTCTGCTGGAGGAATACAAAAATACCTAGATGCTGCAACATGTCCATGAGGGTC
 CGGCGCCACTCTGACCCCTGCCCGGAGGGGAGCTGAGCGTGTGACAGTATTAGTGAGTGGGTAACGGCGGCAGA
 CAAAAAGACTGCAGTGGACATGTGCGGCGGGACGGTACAGTCTTGAAAAGGTCCTGTATCAAAAGGCCAACTGA
 AGCAATACTTCTACGAGACCAAGTGCATCCCATGGTTACACAAAAGAAGGTCAGGGGATAGACAAAAGGCAT
 TGGAACTCCAGTGCAGAACACCCAGTGTACGTGCGGGCCCTTACCATGGATAGCAAAAAGAGAATTGGCTGGCG
 ATTCATAAGGATAGACACTTCTGTGTATGTACATTGACATTAAGGGGAAGATAGTGGATTTATGTTGTATAGA
 TTAGATTATATTGAGACAAAAATATCTATTTGTATATATACATAACAGGGTAAATATTTCAGTTAAGAAAAAATA
 ATTTTATGAATGCATGTATAAATGAAGTTTATACAGTACAGTGGTTCTACAATCTATTTATTGGACATGTCCATGA
 CCAGAAGGGAAACAGTCAATTTGCGCACAACTTAAAAAGTCTGCATTACATTTCTTGATAATGTTGTGTTTTGTTGCC
 GTTCCCAAGAAGTGAACATAAAAAGTTAAAAAATAATAAATTCATGCTGCTTTAATTTGTAATTGATAATA
 ACTGTCCTCTTTCAGAAAACAGAAAAACACACACACACAACAAAAATTTGAACCAAAACATTTCCGTTTACATT
 TTAGACAGTAAGTATCTTCTGTTTGTAGTACTATCTGTTTTACTGCTTTTAACTTCTGATAGCGTTGGAATTA
 AAACAATGTCAAGGTGCTGTGTGCTATTGCTTTACTGGCTTAGGGGATGGGGGATGGGGGATATTTTTGTTGTTT
 TGTGTTTTTTTTTCTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTAGTTCACAGGGAGTAGAGATGGGGAAAGAATTCCTACAATA
 TATATCTGGCTGATAAAAAGATACATTTGTATGTTGTGAAGATGTTTGAATATCGATCAGATGACTAGAAAGTGAA
 TAAAAATTAAGGCAACTGAACAAAAAATGCTCACACTCCACATCCCGTGTGACCTCCAGGCCCGCTCATTCT
 TTGGCGTTGGTCAGAGTAAGCTGCTTTGACGGAAGGACCTATGTTGCTCAGAACACATTTTCCCCCCTCC
 CCTCTGGTCTCTCTTTGTTTTGTTTTAAGGAAGAAAAATCAGTTGCGCGTTCTGAAATATTTTACCACCTGCTGTGA
 ACAAGTGAACACATTTGTGTACATCATGACACTCGTATAAGCATGGAGAACAGTGATTTTTTTTTAGAACAGAAAAC
 AACAAAAATAACCCCAAAATGAAGATTAATTTTTATGAGGAGTGAACATTTGGGTAAATCATGGCTAAGCTTAAAA
 AAAACTCATGGTGAAGCTTAAACAATGCTTGTAAAGCAAAAGGTAGAGCCCTGTATCAACCCAGAAACACCTAGATCA
 GAACAGGAATCCACATTTGCCAGTGCATGAGACTGAACAGCCAAATGGAGGCTATGTGGAGTTGGCATTGCATTTAC
 CGGCAGTGCAGGAGGAATTTCTGAGTGGCCATCCCAAGGTCTAGGTGGAGGTGGGGCATGGTATTTGAGACATTTCA
 AAACGAAGGCCCTGAAGGACCCCTCAGAGGTGGCTCTGGAATGACATGTGTCAAGCTGCTTGGACCTCGTCTTTA
 AGTGCTTACATTAATCTAATGCTCAAGAGTTCTCGACTGGAGGACCACACTCAAGCCGACTTATGCCACCATC
 CCACCTCTGGATAATTTTGCATAAAAATGGATTAGCCTGGAGCAGGTTGGGAGCCAAATGTGGCATTGTTGATCATG
 AGATTTGATGCAATGAGATAGAAGATGTTGCTACCTGAACACTTATTGCTTTGAACTAGACTTGAGGAAACAGGG
 TTTATCTTTTGAAGACTTTTGGTAAGGAAAAGGAAACAGGAAAAGAAAACCCCAACTCAGGCCGAATGATCAAGGG
 GACCCATAGGAATCTTGTCCAGAGACAGACTTCGGGAAGGTGTCTGGACATTCAGAACACCAAGACTTGAAGGTG
 CCTTGTCTCAATGGAAGAGGCCAGGACAGAGCTGACAAAATTTGCTCCCCAGTGAAGGCCACAGCAACCTTCTGCC
 ATCTGTCTGTTCATGGAGAGGGTCCCTGCCCTACCCTGCTGCTTTTGGGTTAGGAGAAGTCAAGTTGGGAGCCTGA
 AATAGTGGTTCTTGGAAAAATGGATCCCAAGTGAAGACTAGAGCTCTAAGCCCAATTCAGCCCAATTTACACCTGAAA
 ATGTTAGTGATCACCCTGGACCAGCATCCTTAAGTATCAGAAGCCCCAAGCAATGCTGCATCTTAGTAGGGTG
 AGGATAAGCAAAAGAGGATGTTACCATAACCCAGGAATGAAGATACCATCAGCAAAAGAAATTTCAATTTGTTTCACT

CTTTCATTTAGAGCTAGTCTTTCACAGTACCATCTGAATACCTCTTTGAAAGAAGGAAGACTTTACGTAGTGTAGAT
TTGTTTTGTGTGTTTTGAAAAATATTATCTTTGTAAATTATTTTTAATATGTAAGGAATGCTTGGAAATATCTGCTATAT
GTCAACTTTATGCAGCTTCCTTTTGGAGGACAAATTTAAAACAAAACAACCCCCATCACAAACTTAAAGGATTGCAA
GGCCAGATCTGTTAAGTGGTTTCATAGGAGACACATCCAGCAATTGTGTGGTCAGTGGCTCTTTACCCAATAAGA
TACATCACAGTCACATGCTTGATGGTTATGTTGACCTAAGATTTATTTGTTAAAATCTCTCTCTGTTGTGTTTCGT
TCTTGTCTGTTTTGTTTTGTTTTTAAAGTCTTGCTGTGGTCTCTTTGTGGCAGAAGTGTTCATGCATGGCAGCA
GGCTGTGTGCTTTTTTATGGCGATTCCCATTTGAAAATGTAAGTAAATGCTGTGGCCTGTTCTCTATGGTAAAG
ATATTATTCACCATGTAAAACAAAAACAATATTATTGTATTTAGTATATTTATATAAATTATGTTATTGAAAAAA
ATTGGCATTAAACTTAAACGCATCAGAACCTATTGTAATACAAGTCTATTTAAGTGTACTAATTAACATATAAT
ATATGTTTTAAATATAGAAATTTTTAATGTTTTTAAATATATTTTCAAAGTACATAAAA

(SEQ ID NO: 11)

>hg18_Gen conocido_uc009yjg.1 intervalo=cr11:27633018-27679176 relleno 5' = 0 relleno 3' = 0
hebra=- repetir enmascaramiento=ninguno

GTAACCAATAGCCCCATGCTCTGTGCGATTTCAATTGTGTGCTCGCGTTCGCAAGCTCCGTAGTGCAGGAAGGTGC
GGGAAGgtgtgtctgtggcccggaacgcacgcccctctcccagagaacttgggtgctgggatggggaggaagggga
gagt tgaagactagggagcgagacctcggggcggtgcgattctcactcgctccctcccggccagcggccacagccg
gggtttctgcagagggcgcgggacgcgggttccccggggctgaggctgggctggaacacccctcgaagccgcggg
cgtctgtccaagggcggccaggagggcgcaggactcgcagggcgatgtcgggggccctaggggaggaggtgagga
cagggcccggggagcggggaggttccgggcccctcgggtccccgcgcgaggaagaaagcgcggcggttccctttaag
cggccgcctcgaacgggtatcggtagcggggcgagcggggagcggggggcggggggggggggggggggggggggcgc
cgttgaccaatcgaagctcaaccgaagagctaaataatgtctgaccggcgcaagggcgagcctggagctccggg
tccccgacgtgcgcgcggcgcccggggcaccggcccctcgtctgctccgcgcaccccgtagcgcctcgggctc
ccgggcccagacagaggagccagcccgtgcccctccacctcctgctcggggggctttaatgagacaccaccgct
gctgtggggccggcgggagcagcaaccgcaggggaccggggctgggctggagccagaatcggaaccacgatgt
gactccgcgcgggggaccctgaggtttgtgtggaacccaggttaggcaagcgtgggaatggggcttggtgcagg
agctgcccgcggcgggagagagttgactgggggatccccaccaccaagttgtgggacgagccagctcctctctt
tccctcccctccggtagaagggacgatttggagttactcttggggagtttctccccatcccacaaccagaaggtc
agccggcaccaccagggaaaaagggaccggggaagtcacgaagtagaggagggaaaggcctggaggagaccagagc
tgctgatgggagcaaaagcggcgaccggggtaccctcgcagcccctccccagccaggagtagtcgagagagact
tagggggccagagctgtcgagggctcctgactgaggggaggggtgctggggctaggctaggaatccttccagggggtg
gtgtccccgcggcacttgcgggggagtgaggaggaagcttgcgcctcagcccgcattcccttccccggagctgc
acacggctacctgctccccaggaattgagactgaagtgacttacaagtcgaagccaatgtagcttggaaaacttg
ggaggcgaattcctaccgctgggaactgaaaggtctgcgacactcgggagggccgaaccacatctctaccaca
tcttgcgcccctcttctgaagcggcctccagggaaagtttaagagttttagcttccggggagtggttgggatgtacgtg
gggattctttagctcgggttagtctctggggatgcagagccgggaagaggaatgggtgagtgagttactcctggaaa
gaaatagctgaggttgggggctctgtgcctgacgggcaagaagaaggggagattacagactagggcattccctaa
gaagaagcctcggggctgcgaggggtaactggaggatgcagtggttgtgtgtggggtagagcggggatgagggac
cggggtggaggggagggagggaggggaggggaggggagggagggagggagggagggagggagggagggagggg
ccatgctgccaagagcagctactggggcgggagggctgggggtggggaagtggttaaggaaggttttgcgggatccc
ttagagagctggtaggagggacttgtgaatggtgctgactccagctcggggtggggcgtgcgactcgtcgtcggg
ggattttagctcctcgttcttggcttctatgcaagtttctcgcgctgggggagcttgataagcctcgatt
ggcgggtgtttagggcttcttggatcttattttagggctctagttatcctgcacttactccttaatgtcagtagc
aaccaaagaacatttccgacaagcagcaggaatgttcttggccagaagcaagaagggcatatttctgagtggtt
attaatcctcctagtaatctttaaagcaaaagtaataatgtaattgggaacgttgatttctactgcataaaaagg
cgacatgatataaatgagaccctccctactgactcaataatcctgcaaaatctctctctcccctttattattatgg
aaaaatctattttataggttgggtgtaaggtcaaaagccatttgggtcttacaatttgatagcttcttactatt
taacttattgaggcataattacagatttaattgtatgaacggtgtgtgccttcaatgcttatctcatgcaacataat
tttaggttggagatttctgatgttatggcatgtagcgttcaaggcattacacataataggtaacatagcatgttg
aaattacaccacaaagtttgaccctgggaacagcacctttaaacaacactcactaaactcctgttctgttttctg
atttggcaaatgccttgcctaaagacttt
caggaggttaaaaaaaggaagagacacttgttgaatgtaaccataaccttactggaaatttaaacatggttg
tcaccattactggaaattccagggccataaagtcggtgtcttttttttcttacttcaatttggtaaaatgtgataaa
tgttggtaaatatagaccagtagtaagattatgacactaaaagcattatgtatgtggaactattttaagttattac
agaacatttctatttataaatgataaagcagaagaaatgatttccagataaacaaggcttacgtacatgttttg
aagcattagaacattgcagacactcttagacatcacatttttaagcaaaataacagtaattttcacataccttt
ggagccttctcatagcccattcagagctgagttagtagctggagtttcttattttaaggtgatattttaaacca
ttaacatgtatagtaggtcaacattggtgcatccagaaaatgaagcatttaggaaatctgtttcagtgcttttca

gcaatggttgaggggacttggatgcatgacttagggacaagaaaacttaggctggaatggcaagtgggttttgaat
 gttgggttgagaagaattctaaaactgtgaaggattagtaaaaaaacattcagattgctaagcctactgtggctg
 ggagattagagtgtcaacatgtgtgatgtatTTTTGACATCCTTATTTGAGGATGGGCTTCAAAGATTTGACGAAC
 TGTcATAAGTgTAATTTGTGTTGCTTcAGACAGCAGTtctagaaccaatgatgtaaaTTAGATACTCTACATGGTA
 gTtagaaaactttccattaatttaatttagcaaatattgaaTgctcactgcatacagagcactttattagaggaata
 tataataaagaaaaagaggtctgggtggtggctcatgctgtaatcccagcactctgggaggtgaggtgggagg
 atcacttgagcccaggagatcattacagctctggacaacatagcaagaccccatctttacaaaagacaaaaaaatt
 atccaagcctgggtgacagggcacttgtagtcccagctacttgggaggtgagggcagtaggacgtttgagcccaggag
 gttggggctgacgtgagccgtgattgtcccactgctctcagcctgggtgacagagtgagaccccgttggagggaaag
 gaaggaaggaaggaagaaaggttaggaaggctgaaatgaaacccttttagaaatgacactaaaatgggaggttggag
 taaggtatTTTctgaagtgcctttgtacttgtTTTTTctaatgcatTggccataagtctgctccttatttatagtc
 cataaacaatcctaattgagaacagttatatttctgctttgaaTcatctactTgaagtgtttagcatcatgaaat
 gagtacagaaaatccctccatttctttgcaaagcgtgTattttactTTTccttattTgtatacagattctcaaaa
 ttggctatTTTtctttgggttagacagaaacagaatgtctggaaaaaaaagtTcttatcaaatcaggtgcccAAAT
 TgcttaagaaattaactTTTgaggttatTTTTTTtagggtcagtagctaaactaagaaaactTctcaccgtTcAC
 ctTcactTTTggaaaccacaaaatcttcagatattacagTttTccaaagagTtTctTTTTtaataaaactaaaa
 ggaattgactcctccccaaactccctcaggcctcagcatggatagagTtactTTTTTctttaaataatttatttata
 acttattttgctctctgtagaacagctggagattaaagcaacatggccatgacataaaaTgaagTtagacataag
 atgagcagcccactccaagtatgaatgagTacttattctttgtgatctctcatactgctTTTtaggtatTaatagTgt
 cagTcagcaaaagcaaacagTtTaatattTAcAtctcctTtaggatatcatatagTttatagTttgtatgtgtctTg
 cgtgatgtTTTctctgtTtcaaattctTTTTTctaaagtaagaatgttatatgtagcaaatggTtctTTcattA
 attcattTgtTaatTcaccgtgcattAattgagTgcccagTgagTgtcagggcactgggTactTggattTctTTTcc
 ctgtattTgatccatatactTcaggtgctcctTgatTggctctccattgactctctcatataaggctTTcattacc
 tattcacatactccctcccaaagagagTggtccaaaagTaaaaTctTgagcaagTtctctgagTtattTcagaact
 tctTgccccaaaactgtatTTTTaattattgactggtagcattTTTggaaTaaactTaccTctctTTTTtaagattga
 agTtctTTatcctctctgattTTTcaggtgtcagTttgtgtacaaattgagacaataaaaatgtTgtTtagacattTT
 ctTaaagcattTTTgctatgtgagaatctTtcatgaaagaaactctTTTTtaacaatgactctatagcagaagccacagT
 gagggagaactactgaaTcaaagatggTgtTgagTctatgattTTTatgatggattTTTTTTTTTTTtacatacaag
 gatagcatgggtctTTTtagTattcaggaactgtTctTcactTgacagTattTataaaattgtgtgtTTccccctaa
 aaaaactTaaattgtgaaTgctTccattTactgaaagTggtTaatgattatgTccaaataagcaaaataagcag
 aaaaactcagTttagTgaataactTTTTgcctTtaaatttagTaaTtagTaaacagTatctctTTggggTtactaga
 aaccactTTTTaatccaataggtctctTtcatTgtgaaTcagggagTgattTTTgctTaaatgtTgagTataggaat
 ctatTgtggTgtTcaaggaTcatgTaaatTgctgatataatcggagcagcagTttggcatcattaaactcagaaata
 tTtaaactctTgctatacaacatggaagcaaaactTgtgcatagTttgtgtgtgtgtgtgtgTgaaTctcaaaaaa
 agaaaaaatcacaggaTcaggaagTcggaaTgagTcccactTTTctctagTaccaaaactacagcattTccta
 gcctTctctTTTactcccaagcaagacagacagggcaaatgaccatcctgctgcccattTctgtgtatattcactTgc
 attgagagTgtTattcacctgctTgtTgagagTattcacaatggTaccTgataaagTtagatactTctTtaaactg
 TgaattTTTTTgcatTgtataatgtTtagaaataatcatgtataaatggTtgaatTaatacaggaTtgccTatc
 aagTattTtatTaatcattaaaaTgtggTgtcattAatacaattTatTTTTaagTgctTTTcctaaaaataccagatta
 TTTTctgattTTTcacatccctgacaatgactTTcTtaaactTgtagccaggaacagaaaaactaacactgcagTgt
 tctcactcaaatggagTgagTgaacagagagaacacatggactcagggaggggaaccacacagctggggcctggag
 cagggggcaggggaagggagagagTgctcaggaacaaacagacaaatagctaatgcatgagcctTaatcactagg
 TgatgggtTgataggtgagcaaacaccatgacacataTTTaccTatgTaaacaaactgcacattctgcacatgta
 tcccggaaactTaaagTaaaaataaaaaataataaaaaataaaactTtagTgcatctattgtTccagagcctgt
 aattgctctTcaggcagTctcacaTaaaaaacttaggagaacctTcactgTcactgtTccatgaggtgttaggaaaac
 ttgctcactgTcagTgcccagTaggcattTgTactgagacccaaatTcagctggTttgtTgtTactacgattccta
 cgtgattTcactTgtcatgtagacaagattgcacactTcaataataatctTgtccaaatgtTgtggTattccatacat
 TTTTaaatgcatTcacataTctcattccattTgatcctacaaataactctataaaaaagattggcagacattattt
 ctatataacagaggaggaactggagcttagagaagctaaatagcaatccaaaatgcacagctgtagaacagagca
 aggatgatagcccagTgactTcacctaacctagTcccctTaccaccactccagctgTctataacccaaaactgcagT
 attcaagTaaagaaaccatctTgcccTtgatgcatTaatgtgagacctggagcaggaacaggtgatattgtcacc
 ctggcctactgTccactTtTgctccagcagagactggTaccctTctgtgtgccaaggaataaaagTggTaatgggaa
 gattaaaaatgtTTTTTccaaggagTTTTTaaTTTaaTTTTTaaaaaagaaaaaactcttagagggaaaaatga
 atatatgactTTTgatgtattgtTccttagTaaacttagTtataTTTTTactTaaactgagactctTgctaagtga
 TgattagaaatattagTggctggccagatggcaaataggaacagctgcagTctgcagTcccagagagatcaatgc
 agaaggtgggtgattTctgattTccaactgaggtaccgggctcatctcattTgggactggTtagacagTgggtgcag
 ccaatggagggTgagccaaagcagggTggagcattgctcactcaggaagcgaaggggtcaggggaactccctccc
 ctagccaaaggaagccctgagggactTgcccagTgagggacagTgctatctggccagatacactacattTcctacag
 tctTtgcagccggcagaccagggagattccctTgggtgctacaccaccagggccctgggtTtcaagTaaaaactgg
 gtggccattTgggcagacacccagTtagctgcagggagTTTTTctcaTaccctagTggcactgaaatTccagTgag

acagaaccattcactccccggaaagggctgaaggccaggcagccaagtgatctagctcagcagatcccacccca
 tggagcacggcaaggtaagatctgctggttgaattctcactgccagcacagctgcctgaagtcaacctgggatgc
 tccagcttggctgggggaggggcatccgccattactgaggcttgagtaggctgttttctctcacaatgtaaaacaa
 gccactgggaagtgtgaactgggtggagcctaccacagctcagcaaagccctgtagccagattgcctctctagatt
 ctccctctctgggcagggcatctgggaaagaaaggcagcagccccagtcaggggcttatagataaaactcccatctc
 atgggacagagcacctgggagaggggggtgctgtgggcccagcttcagcagacttaaatgttctttgctgttggct
 gtgaagagacagtgatctcccagcacagcacttgagctctgctaaggacagactgccttcttaagcaggtccct
 gaccctctgattcctgagtgaggagacacctcccagcaggggtcgacagacacttcatacaggagagctctggctgg
 catctgggtgggtgcccctctgggacaaaccttccagaggaaggaacaggcagcagctcttctgtgttctgcagcttct
 gctgggtgatcccaggcaaacagggctctggagtgacctccaccaaattccagcagacctgcagcagaggggctga
 ctgtagaaggaaaactaacaacaggaatagcatcaacatcaacaaaaaggatgtccacacgaaaacccgtacaa
 aggtcgccaacatcaaagatcaaacatagataaatccacaaggatgaggaaaaatccagcacaacaaaggctgaaatt
 ccaaaaaccagaatgcctctctcctcacaaggagcacaactctttgcccagcaagggaacaaactggatggagaat
 gaggttgatgaattgacagaaagtatgcttcagaaagtgggtaaaaaacagactcctccaagctaaaggagctgctct
 aaccaatgcaagaagctaaagaccttgaaaaagggtggaggaattgctaactagaataactagtttagagaaga
 acataaatgacctaatggagctgaaaaacacagcagcagaaactctgtgaagcatacacaagcttcaataactgaatc
 gataaagcagaggaaggatatacagagattgaagatcaatttaatagaaataaagcatgaagacaagatttagaagaaa
 aaagaatgaaaaggaaggaacaaagcctccaagaaatgtgggactatgtgaaaagaccaaacctacatttcatgtgt
 gtacctgaaagtggcgggacaatggaaccaagtggaaaaactccttaggataattatccaggagaacttccccaa
 actagcaagacaagccaacattcaaatccaggaatcacagagaacaccacaagataaccctcaagaagagcaaac
 caagacatgtaattgtcagattcaccaggttgaatgcaggaaaaaaagtttaagggcagcgagagagaaaggctcgg
 gttacccaaaaaggaagccatcagactaacagtgatctctcagcagaaacctacaagcctacaagccagaaga
 gagtggggccaatattcaacattcttaagaaaagaatttcaaccagaatttcatatccagccaactaagcttc
 agaagtgaagtagaaataaaatcctttacagacgagcaaatgctgagagattttgtcaccaccaggcagccttaca
 agactcctgaaggaagtactaaataaggaaggaacccggtagcagcactgcagaaacataccaaattgtaaa
 gaccattgaaactatgaagaaactgcatcaactaatgggcaaaaataaccagctaacatcaatgacaggtcaaat
 tcacacatacaaatattaaccttaaatataaatgggctaaatgcccatttaaaagaccacagactggcaaatgga
 taagagtcagaccatcagtgctgtgttctggagaccatctcacatgcaaagacacacataggctgaaata
 aagggtgaggaagatctaccaagcaaatggaaagcaaaaaaaagcaggggttgaatcctagtctctgataaaa
 cagactttaaaccacaagatcaaaagagacaaagaaggccattacataatgataaaggatcaattcaacaagaa
 gagtaactatcctaacaatataatgcaccaatcacaggaaccagattcataaagcaattcttagagaccaca
 aagagaccaagactcccacacaataatagtgtagactttaacaccccaatgtcaatattagggtcaagcagacagaa
 aattaacaagcatattcaggatttgaactcagctctggaccagtggaactaatagacatctacagaactctccacc
 ccatatcaacagaatatacattctctcagcaccacatcacacttattctaaaattgaccacataattggaagtaa
 acactcctcagcaaatgcaaaagaaatgaaatcatacaaacagctctctcagaccaaagtcaatataattagaact
 caggattaaagaaactaactcaaaaccatacaactcagtggaactgaacaacctgctcctgaaatgactactgagta
 aatacaaaaagagcagaaataaaatcacattttgagaccaatgagaataaagatacaacataccagaatctctg
 ggacacagctaaaacagtgtttaggggaaattcatagcaataaatgcccacaggagaaagcaggaataaaat
 caacacttaacatcacaattaaaggaactagagaagcaagacacattcaaaagctagcagaagacaagaaa
 taactaagatcagagcagaactgaaggagattagagacacaaaaacccttcaaaaaaatcagtgaaatccagaagct
 ggtttttgaaaagattaacaaaatagatagaatgctagccagattgataaagaagaaaagagagaagaatcaaaata
 gacgcaataaaagatgataaaggagatataccactgatcccacaaaaatacaatctaccatcagagaacactataa
 acacctctatgcaataaactagaaaaatctagaagaaatgaaataatctctggacacatacaccctcctaagactaa
 aggaagaagtcaaatcctgaaatagaccaataaagtctgaaatcgaggcagtaattaacagcctaccaacccaaa
 aaaagcccaggaccagacggattcacagctgaattctaccagaagtacaagaagagctggtaccattccttctgaa
 actattccaatcaatagaaaaggagggaatcctccctaactcattttatgagtcgggcatcatcctgatacaaaac
 ctggcagagacacagcaaaaaataaaatgttaggccaatatccctgatgaacattgatgcaaaaatcttcaataaa
 aaactggtaaaactgaatccagcagcacatcaaaaagcttatctaccatgataattggcttcatcctgggatgcaa
 ggctgggtcaacatgcaaatcaataaagataatccatcacataaagagaaccaatgacaaaaaccacatgattat
 tcaatagatgcagaaaaagcctttcataaaaatcaacagcccttcatgctaaaaacttcaataaactaggtattg
 atggaacataatcaaaaataaagagctatttatgagaaacccacagccaatatacactgaaatgggcaaaagctg
 gaagcattcatttgaaaaacggcacaacaaaggaatgcctctgtcaccactcctattcaacatagttatggagctt
 ctagccagggcaatcaggcaatagaaagaaaataagcattatcaaataggaagagaggaaagtcaaatgtctctgtt
 tgcagatgacatgattgtatatttagaaaacccatctctcagcccaaaatctccttaagctgataagcaacttca
 gcaagctcagagatacaaaatcaatgtgcaaaaatcacagcacttctatacacaataatgacaaacagccaagt
 catgagtaactcccattcaaatgttcaaaagagaataaaatgcctaggaatacaacttacaagggatgtgaagg
 acctctttaaagagaactacaacacctgctcaatgaaataagagaggacacaaacaaatggaagaacattccattc
 tcatggataggaagaatcaatatcgtgaaaatggccatactgoccaaagtaatttatagatccaatgctatccccat
 caagctaccattgacttcttcatagaattagaaaaactactttaaatctcatatggaacaaaaaacagcccgtat
 tagccaagacaatcctaagcaaaatgaacaagctggaggcatcatgctacctgacttcaactatactacaaggcta

cagtaacccaaacatcatggtactggtacataaacagatagatagaccaatggaacagaacagaggcctcagaaata
 acgccacacatctacaacatctgatccttgacaaaacatgacaaaaacaagcaatgcagaaggattccctatttaa
 taaatgggtgctcggaaaaactggctagccatttgacagaaaactgaaactggacccttccttacacgttatacaaaa
 ttaactcaagatggattaaagacttaaacataaaaacataaaaaccataaaaaccctagaagaaaacctaggcaatacc
 attcaggacataggtatggcaagacttcatgactaaaataccaaaagcaatggcaacaaaagccaaaattgacaaa
 tgggatctaattaaactaaagagcttctgcacagcaaaaagaaactaacatcagagtgaacaggcaaccgacagaatg
 ggtgaaatTTTTGCAACGTATCCATCTGACAAAAGGCTAATATCCAGAATCTACAAGGAACCTAAACAAGTTTACA
 agaaaaaaaaacaaccccatcaaaaagtgggcaagggtatgaacagatgcttctcaaaagaagaaatTTATGCTGCC
 acaaacatacgaagaaaagctcatcatcactgggtcattagagaaaatgcaaatcaaaaccacagtgcagatccatct
 tatgccagttagaatggcgatcattaaaaagtcaggaaacaacagatgcaggagaggatgtagagaaaataggaacac
 ttttacactgttgggtgggagtgaaattagttcaaccattgtggaagacagtggtgattcctcaaggatctagaa
 ccagaaatacttttgaccagccatcccattactgggtatataactcaaggattataaatcatgctactataaaga
 cacatgcacatgtatgtttatgtggcactattcaaatagcaaaagacttggaaaccaatccgaatgcccatcaatga
 tagactggataaagaaaatgtgacacacataccatggaaactatgcagccataaaaaaggatgagttcatgtcc
 tttgcaggacatggatgaagctggaaaccatcattcttggcaaggtaacacaggaaacagaaaaccaaaccacat
 gttctcactcataagtgggagtgaaacagtgagaacacatggacactgggaggagaacatcacacactggggcctgt
 cagggtgtaggggcttaggggaggatagcataggagaaaacctaatagtagatgacaagttgatgagtgacgaa
 accacatggcatgatacctaggtaacaaactgcacgttctgcacatgtaaccagaaactgaaagattaaagtattat
 attattattataataataataaaaaagaaatacaataaaaatagaatgcagcatacagcagtgattcctcaaacat
 tcagcatcagaattacccttgaatctttaaaatatatacatatgagatcttagtctccaagatttgtaagtttgg
 tattgggtccctgggcctatgttgggttagaaacttctacagatggtttggatgtagggacagtttaagaatcgc
 tgaactaaaatcaaaataactgaatatcctgtgatttagagagacttatcgtttatttcaactatccaagtacttgc
 ttagagcgtggctagaaggatttgacgcttgtaataatcagaaattcagacattttgagatgagagaactgctg
 aagattttatctgacttgaataaaatTTCTAATTGAAACTTCCAGGTGAGAGCAAAGCCTGGAACAATATCC
 tgagccagaggagatcgagttgactccaggcctaacaacttactaggtctatgacctgggtcagtaatttaaatt
 ctctgtatctcaacctctcaacagggtattggtagggattaaatggttagtctgtgaagtgcttagagcagtg
 ttggcatagtaaatgcttaatgaatctcagccactgttttatttttagtacttccagctcccccaaaaagatact
 ttttttagacttgtattaagacaataaaaagtttaacagcatgcttcatacctaaatagcttcaactttatagcaa
 agtttaacagactaaaactgttttggtaattctctgagctcatggttttattaatgatttttctgctgtttat
 tcatctgaattctactcattcttcaagacctagctggaactctgtttctagaaagactcttgccataataataaac
 ctgccctatctgagttcctagggtgctgtacctcataatttggttaattaatgtatagcactataatacaaac
 attattgtgtgctttgctgtatcagattctaggctggaagtgttagatagatgttttctgctagaaaatgttct
 agaatgtcctactcaggacagctctgttgaacttaaaagacacatttccaaacagacacttcatgaggcagccccagc
 ctgtactgttctctggacctgatgatcaagtttgatttaagcctcaccacttactagctctgtgattttgggcaa
 gtacttgaattctctgtgtgtagatagaacaaatgtgagggaaaaccccttcccccatctgtgtttcccaaac
 gaacttgcctcctaataagtaaacacttccagggaatattctaggcccttctcttccccattactgttcttct
 gtgaaaagaggagaggttaactctgatggatgaaatccttaacttctcatctctggactgtagagcctgtgaacaa
 agcaatggaccacttgactgaaattgaggtgaccctgtatTTTgattcttatttggaacttatttctattctgt
 tcccaattcaaaatcccaaggggagaaggaataattgattaccagaagtatgtaatgggtgtaggaagttgaaata
 aatggtaactttttaaagttgcatgagatagtccttatcccagagaagtaagtttgccttttcttctctcat
 gtattttagtatttatttcaaatagattgtaaacctttaaagcaagaatatttctacttcttcaactctga
 tagcacacagtagactgctgggcacatacatagtaggtggctctgtaggtacttgctaaatgattcaacatgtttt
 ccctcatggaagaaagatttcagatattgttcttatcagctaggaaggcactctgaaataggaatcagttctaggc
 aggtatccataaatgggttagatttccaacttacttgcaccagaggctogctaatgtgaaactctcatgggtact
 ttgtcttgcctcatgagctatacatgctaaggggttagcagatcatataatcttttgatctacaaaatagatctt
 attgacaaaaacttgggccaaggccttctccttggccacttctccctcttttcaattctctttttgggaatg
 ccctttgtgatgttagttacagcatgtaccacattgcaactgtattgttggttttgggtctaacccaccttaaca
 ctgcagtcaccaagggcagaaaatcagctcattcattttgatgtcctcagtgctgtgctcagagaatatctatta
 tttgaaaaaatagtgcaaaagtaatttaggagactacatcacactcatctaaactgcaagttgacaagttgaca
 tccaaaagaaaggctctcctaataaacctcgccacagaaaattgggtgacctttagctctggagaagcagaggc
 aaaaatgaaacctaaaattatttgggtttttaaataatgtttctcatggagttaaggctcagactgagttct
 tttcatatgagggatgacagaaacacagctgggtctgacttccagcttcaactgagcagcagcagctctgctgggt
 aaacaggaacttgtattgtgcccctgacgtgcaacttgaagggtcagctcattgtcccttgttcaataaatagt
 ttttaagaattgtttttgatcttgtgagccttaactaaatgattaacatgcaagttggccatttggggtata
 ctgaagcacttctctttagggctattgacaggtgggaatgtgcccactctctgggtctctggttttcatgtcaca
 ttgcaaatcagtgacagtttaaacttgggcaatcacttagcaagctcattgagttaccaagttatttcccact
 ttgatgaagcaaccttgaaaatgatttctaaagcaagtaacatccaaactcagtaacctttaaataacctttgc
 tgaatgaaataactgactaaatcataaaaaatgtaacatctttaaattcttacttaccggcagtttaagcctctgt
 gtaagaggagcctcggttgagataacataggaatgtaagcctcctagagaaatttctaatggaacatggtctg
 ctatgaagctagaagtgagaggacattatatttgaccattatatttgctcagagcttctcaacatggggcccaa

gtcaaggtcccttggttcattaagaggaggtccaggagtgcatgacacccatcagactactgagaccagctggaac
taggcacctgacagggccttgccatacaaaatagttcttattttctgagttccaagtaactagtttctctaa
cccagtgctggatagtagtgccaagtgaggtagcttcaatgaacttctcatgaggttatttctagcctattgga
atggttcgttttaggagggtaggaagggaggtctgaaattttctgcttagtttaattgtgtgatagcctttgac
catccgtttaaaggagatctgtttccagatgactatacatgtggaaaggagaagtttttgagtggttttttaa
cccctttaaagaatggttttcttagtctctacattgggggtaaaaggctcttagggagactttcaaaagt
atgtgaagtttgcatctgatttcagaggtgagttggaggcctatctgtgtatgacagacacatgtctccaacaacta
tatgttcacaaggactaagagccatcctttgggtccatcattcaacattgatctcacattcgtgttctgtatcagta
tctttacagtgcgctcccagttacatctcctaatttcccttagtaggcttcacagaatttgagtgatgcaatgg
cagatgaccacatgtggagtcatttaaccacatcttccactgcaagtcagcccgtcttgatgtctgtttatgttta
gattccatcttttggaaagatttcatcctctgcaactatctcagta tctcagatgcttttgagactgggtcctttcc
cctcctatgtttggccatggccaccccctcaggggtgtgtgtgtttcacagctgctgtttgttaggggtgaccttta
caatgtacaagctcttcccatatgttgacaatccctgggtgtgatgctgtgagttaggcaggggtgtatagcgtgt
cctcatcatattacagtggttaaggcaacaggggttttgaatttgatcaccatgaatttgtctaatttgttggtaaa
aaatgggtcatgtatcagccgtttcacagggctcagcttaatagaaagtgagggttaggcaggaccagaattcaggact
tcagccccgggtcccaggactattctctatacccaattgtcccacttgaatcagtttcttctagggaaatctctc
caaaactgagatggcaccacaggacttcttaattgtagtattaccaggaaaaaagcaaaaggaactgggtgtaa
tctctgttttgggtgattgggtggagattggagattgtctgtgtcaaaagtaagccactagattaaatgtttgt
taataaattgggttatttttaatttaattatttgacagtttaattacattattcaaaaatcaaaaataaatttaaag
aagtttcaactgaaaagtcttgcccacttataccctgctcacctcagtatcccccaatacataacctctataaggt
gatcatttgtattagtttctgtgaaatccttgatagtggttttataatagatacaggtaaatagatgactactat
tattccccccaccaccctgttttttttgagacggagctctgctctgctgcccagggtggagtgagtggtgca
cgatctcggtcaccgcaagctccaccattttccccatttttaaaacaaaaggtagtagccatatacactattt
tacacctgttttacttactaataataaccagagagctttccatcattttgtacataatgcacctataatctgtca
attattcccagaagtggaaattgctgggtcagcaggaaaaaatcatgataaatttggataggattgctaaattgtcct
gcacagggcttgaattgtttgtactcccactttagtgatgagaagacctgtttctccatagcctcatcaaacaga
gtgtgtgagattagatgagaaataggaggtgagcagcttttaccatccgtagtttgagtgaggaaactgcaca
gttgcaagagctgggtgaggtatcagattagttccagtggaacgctgctcaccatggccatgggcttgcgcccagc
tctagtacacacacgggaatggaccacgttgccacttgcaagaatttctgtagcagaaggtgaaacatgcattcat
tattcatctaactagccatgctggatctaaagagcacaacagtggtttttagaacaaaagaaaattgtttcacta
caacacactgtgtataaggctttcaatgctctttctcagctattaacattattttcaggactgagttcaagagatg
tatccccaaatcacaggatgcttctgtaagcttggaaacttcatactcaagggatgctttttgaggaatgatttta
cacttactcaacatttgttaataaataattagtagctttataagataaaatttaaactgtccaagtacaataaaacat
tgaactatgatgcattatgctagacttttcccttaaagttgccaagtggtttcctgcattaggcaaataggggatc
atataaaaatggcatgatttacggcctagataacatctccaccatttgagcagcatataatccagggtcatccccaca
taactccttaccattctcattagaaggttgattcttagcttattttctctgaggacagcaaaaaaaaaaatccc
ctttagcttccactgcatagaaaaggtggtaaatggagccggcagctggttatttaatttaattaaatgacaatattt
tttataagaattttgacagggccactgtataggggaaagtcactcctcttcccctttatagaagagttgcacctggac
agttgcatgtgactgtatccagctacacaagaggtcattcctgggcataagaatggactgcaaaaatctagctg
aaacaccattgacaaatagacattttctttgttaataaacctgtgaaggctttcataacagacatttccagtttt
gttctcaggctccttgagctgctcctctaaaagtgtgctctcttccaagagctgacaatggccagaagcaaggtgt
tctgtctttgtgccatcatctaaacttgccacacacatttgggatgtcagcctaggtataggttttgtatcccac
tcagatggcttgtgggtctgggttgcctttgtttatctcagctgagggcctctgggcatcagtttgggtgagagaac
ccattccatgaccctccttcccttggctgttttgaactcagtggtcttgttggcacagctctgtgagtgctgtgct
ctatccatgocggaccatctgttctgctgctctgtggtctgaagctgttttctgaactattccttgataataaatt
tgagatgatcttgttctaccttcttcaagtcacatcttagccccttagccacattccogaagaacatgacaaat
ggatgggtcacaagtcacgtagcataggggtgctcagaccacgaggcttgaagggattctgttgggtgctaaaaagaa
agatttgtgtcaccacgatttttttaaaggcatgttgacacttaggccttaattgaaagcgttcttactcaagta
gagttgacagaggagtatttggtagtgcgggttctggtctgaagagcatgtggttctgtttcaatgccaatgaga
tcttctcaggggaaaatgttctgacatctcaacaaatgacctcagatagttttgacaaaatccctattaagt
atgcataataggttggtaaccttgtggttaataactcaactggaacagagtagcaacaagaaacattaggggttat
atthaacctctgtggaattagtggttaacaaactgcttatcagaaatgctcatatggggcttggttaaataaata
agaaactggcatatagggctgcaggatatttctgccaagtagacctccctcactataagacaccacatctatgt
ctgacccccataggaagaggcatagcaagccagcactgggtcatttccctctccaccacataatgggtatgtgat
cttagggaaatccaccgaaactctctggcctcagtttccctcagctataaaatgggtggatacaaaatatttactca
ccattaaataatgttagctattatttttcaagtttaatacaaaagagaacattttacttattttccagctatc
cagagcatcttccaaaatcctatcaccacaaaactctgtattgtatttattatagcaactatgtaaaaaatggagtc
ctgtcctatgcttagatgaaatagttggatattgagtttgcatgtctctataggaatcagtggttagtgaaaacg
gggtggagataaacagatgttttcacagctcctgttgcacagtcaccgcaaatgaaatgtttccataggtgcatt
ctaattggcttaaatgatgcagatatttctggccagccataggtatctttgtcatctaagatgttaataatttctc

tatattttatagtagtcttgaggtagacagccagtttcttgaatagggccacatggctcattatgcacagggcctgga
aactgccttactcgtgctgttgaaatgaaccgtgacacttcagaagagctgggagctggggtagagcagtggttagg
agaacatattcaattatatttctcctcctgcattaagctacaagtaatgagcactttcctgtgctttacagTTAAGTAA
TTAAAAGAAATTATAGAGTGGGATGCAAAAATAACCGAAGGACAACCTGGATGTGTGGAGCCACCAGTTTTCTCCAT
GAGTGCACAAGGTTAATCCTTGTTACTACTCAGAATGCTGAGTTTCTACAGAAAAGGGTTGCAGGTCCACACATGTTT
TGGCGTCTACCCACACGCTTCTGTATGGCATGACTGTGCATCCAGAAGAAGGGCTGTGCTGTGTACCTCCACGTTT
CAGTGGAAATTAACAAAATGATCCCTGAAAATGGTTTCATAAAAGGtgagtaacagagagctaatagccttctcttgc
taattttatctttccccaagatttcttgataatagtttgaaggagtggtattctttggctctctagagggcaactt
acctttccagtttcttccatcacctgttttcatctctcttgttttttaatttaatgctgtatgtatttcagagga
taggatctaactagtgcggtccctcatcaggtgagaattattcatctcattttcatttttagccttctgaattaa
tgacattgaagcccggcagtttggctcctaagatgggtttaattatgtacagatactctttctataatggaattgct
cagataactaattaaccacaagaatacactgtctatggaatattcaggagcaccgtctgtggaactgggaagg
gcatgctgcaccacagctctggggtctattaaaagtgtggttatgcagcactgggtctatgggggttggctct
caactgccagaattccatagcatttcatggcagaagtcagggtgtccagcaatactctgaaagtgcactgttgat
taaagtcgtcaattctgaagaaagagactgaaataagacaaatgggtcttaactttttctcttctctctctgt
aaaaatgtgtgattgttctggcatgttcccaatccccacataatgccacatctttcttaaagggggattcccttt
atccttggatctgagaattattgcatgttctccctttagggacaatgaatgcagttgcatcacccttgccttttttt
ttttttgtacacagcatgcttattcttggatgcaggactgaaagacaaagcccacctggctttcacacacatc
tctattagtaggtgtgcttctgtgtaatttgaaggagggctcccttagctgtgtttacactgtacttttaaatg
tggggctgaaggtagaatcaaccatacttaagatgccacctgggaaaatagggttctgtgtcatctcagccccacc
atgtgcaaatgacttaacagcagcactattagggttcttagtgtagtcatttgcatttggactgggtgaacttgggtg
acttcttgggtgttggaaacaaacaccttggcagcttctcgtaaaaagcctgaacagtggaaccagctccagttct
acttgcacagctgccccatcaaatccctcataatgttcaacttaaaaaatgttacacttttctctggaaatctaac
ctttttcttttttaaaagccattttagtacttcagctcttgaatcaaatgatcccaaatatggacaccaaccta
gaaattgggttacctcctgggaactttatcgaagaagagagattttgggtggagaggggggtttgatgtttgatact
tatatttactattttaataatttcatgtgtgtgtgctgctgctgtatattttgaggtttcgtttgtttaaa
tttcatggtatttggtaggagagagctggatctgttggtttcaggacaagctagaataaagaaatctgccttgagt
gagtgagttgggtccctctgttgcatttaccattaaaggacgaaaggaactcacaaggaccagagacatctggctg
aaagcaatactagtgtagctggacatctactacctgcatagttggctcatatcgtttccagatgattctgtatgag
tgagtgatattaggctatgttcagggatcagggaagctaatatgcttatattgcctttagcattttggtaagaat
taatgatgtgtagatgtccagatttaggtcagcaatattctaaaagttctcattgaaactaatcatgtttataagta
gcctgtactttctatcataataacaatagtggaagagctagttgacataaaaggagcccagattttacttaagtaaa
aacacaaaagcaagatatttcccacataaattacaaaagcaagatatttcccacataaattgccccataaaac
aagttgaaccaaagagaaagatgacaggttaaccgtatgacacgctaagaaagatcataatacttaagtttaactc
aaccttttatttcttaoctaagcagcctctttctctttatcatttagtccctgtgcttctcaactttgataagta
aaaaagttattgcactaaataaattctattgaaatgcaggatctgattgagtggtggggtagggtggaatgaggggtg
gggaagttgagattctgcatttcttagaagtttctactttatgttaaaatggctaatccatctcaacattgagaagt
aaggttctacttaattcagcctgtgtaagtttatcccatatgtacatttccctaaaactctaatctcagggcccag
aatttctccttttagttaaaatatttttaggaataaattgaattgcattaatacacaatttataaaatttaacacaaa
aaattttgaagttgagacttttaggttgcatgaaatcaattcacttgaaaattttctataaaatttcaaaagtc
tgtgtatttaaatacaatttaaatcctgtgttcaactgacatttgttttctgtctctctctccaccatttccaga
gtcatcatccctgtacagaaaaattttcccacatgatttaccataaattcattaaatagatgcttacttgataa
tttctccaggttcttttttttttaattatactttaaagttctagggtaacatgtgcacaacctgcaggtttgttacat
atgtatacatgtgccatgttgggtgtgctgcacccattaactcgtcatttacattaggtatattctcctaagtctatcc
ctccccctaccctactccatgacaggtcccagtggtgtagttccccaccctgtgtccaagtggttctcattgttc
agttcccacctatgagtgagaacatgcgggttttgggtttctgtccttgcatagtttgcagaaatgagtgctcttg
ctcactgatggacatttgggtggctccaagatatttgcatttgaatagtgccgcaataaacatagctgtgcatgtg
tctttatagtagcatgatttataatcctctgggtatataaccagtaaatgggatggctggctcaaatggatattctag
ttctagatcctagaggaaatcgccacactgtcttccaatgatttgaactagtttacagtcctcaacagtgtaaaa
gtgttctatatttctctacatcctttccagcaccgtgtgtttccggactttaatgatcgccatttcaactgggtgag
atggtatctcattgtgggttttgatttgcatttctctgatggccagtgatgagcatttttctatgtgtcttttgg
ctacataaatgtcttcttttgagaagtgctgttcaatccttccaccactttttgatggggtcatttgatttttct
ttgtaaaatttggtttaagttcttttagattctggatattagcccttgtcagatgggtagattgtaaaaattttctcc
cattccgtagggttctctattcactctgatggtagtttcttttctgtgtgcagaagctcttagtttaattagatccca
tttgtcaattttggcttttggttgccattgcttttgggttttagtcatgaagtccttgtccatgcctatgtcctgaa
tggatattgctagggttttctctagggttttatggtttaggtctaacgtgtaagttcttaattcactcttgaaat
atttttgataaggtgtaagaagggatccagtttccagtttctacatatggctagccagttttccagcaccattt
atataatagagaatcctttccccatttcttggtttttctcaggtttgtcaaatcagatgggtgtgagatgtgtgga
ttgtttctgagggctctgttctgttccattggctctatactctgttttggtagcagttaccatgctgttttgggtact
gtagccttgaatatagtttgaagtcaggtagcgtgatgcctccagctttgttcttttgggttaggattgtcttggc

gatgcgggctctttttgggtccatatagaactttaagtagtTTTTTccaattctgtggagaaagtcattggtagc
ttgatggggatggcattgaatctataaaattacctgggtagtagggcattttcatgatattgattcttctaccaca
tgagaatggaaatgttcttccatttggttgcgtcctcttttatttctctgagcagtggttgttagtctccttgaaga
ggtcttccacatcccttgtaagttggattcctaagtagttttattctcttgaacaatgtgaaatgggagttcactc
atgatttggctctctgttctgttattgggtgataggaatgcttgtgatttttgcacattgattttgatcctga
gacttggctgaagttgcttatacagcttaaggagattttgggctgagatgatggggtttctaaataacaatcatgt
catctgcaaacagagacaatttgacttccctctcttccatttgaatatcctttatttcttctattgctgattgcc
ctggctagaacgtccaatactatgttgaataggagtggtgacagaggacatccttgttttgtgccagtttcaagg
gaatgcttccagcttttggccattcagtagacattggctgtgggttgtcgtgaatagctcttatttttgagat
atgtcccatcaatacctagtttatttagagtttttagcacaaggctgttgaattttgtcaaaggcctttctgcat
ctattgagataatcatggtttttgtctttagattctgtttatataatgatggattatatttattgatttgcataatgtgaa
ccagccttgcatacccaggatgaagccaacttgatcatgggtggataagctttttagatgtctgctggattcggtttg
ccagtagtttactgagatttttccatcgatcttccatcagggatattggcctgaaattctctttttgttggctct
ctgtcaggctgtggtatcaggatgatgctggcctcaaaaatgagttaggaggattccctcttttctattgatta
gaatagttcagaatggtaccagctcctccttatacctctggtagaattcagctgtgaaatccatctggtcctgatgg
atTTTTTgggtggtaggctataatttgcctcaatttcagagcctgttattggctattaagagattcaactc
tctcctggtttagtctgggagggtgtgtgtgtccaggaattataaaattcttttaggttttctagtttatttgcata
agaaggtttatagtttctctgtaggttagttttagtatttctgtgggattgggtgtgatacccccttatcaccttt
attgcatctattttagtcttttctcttcttcttatttagtcttgcctagtgatctatcaatttggttgatctttt
aaaaaccagctcctgggttccattgatttttgaaggagttttctgtctctatctcctcagttctactctgatct
tagttatttcttctctctgctagcttttgaatgtgttgcctcttgcctctctaaattgtgatgttaggggtgcaat
tttagatcttctctgcttctcttctgtggcatttagtgctataaaattccctctacacactgctttaaagtgtccc
agagattctggtagttgtgtcttggttctcattgggttcaagaacatctttatttctgccttcaactctgttaagt
accagtagtcaactcaggagcaggttgcctcagttccatgtagttgagtggttctgagtgagtttcttaactcctgag
ttctagtttgaagcactgtagctgagaggcagtttgttataaattctgttctttacatttgcctgaggagtgctt
tacttccaactatgtagtcaatttttggaaatagtggtgatgtgggtccgagaagaatgataattctgttgatttggg
gtggagagttctgtagatgtctattaggtccgcttgggtcagagctgagttcaatttctggatctcttggtaattt
ctgtcttggtagctgtctaaattgaccgtgggggtgataaagtctccattatatttgggtgggagttcaagctc
ctttaggtctcaaggacttgccttggtaactgggtgctcctgtattaggtgcataatatttttaggatagttagc
tcttcttggtaattgatcccttatacattatgtaattggcctctcttggctcttggtagcttgggtttaaagtc
tgttttatcagagactaggattgcaactcctgcttttttggcttccatttcttggtagatcttctccatccct
ttattttgagcctatgtgctctctgcacatgagatgggtctgctgaatacagcacactgatgggtcttgcactctt
atccaatggcagtcctatgctttaaactggagcatttagcccattacatttaaggtaataattggtatgtgtga
atttagctcctgctattatgtagtttagctggttatttggctcgttagttgatgcagtttcttctagcctcaatgatc
tttacaatttggcagtttttgcagtggtggtactggttcttccatggttagtgccttccctcaggagctt
tgaaggcaggcctgggtggtagcaaaaatctctcagcatttgcctgtctgtaaaggattttatttctccttcaactat
gaagcttagtttggctggatataaaatctgggttgaaaaattcttttctttaaagaatgttgaatattggccccact
ctctctggtctgtagagttctgcccgaagatgctgttagtctgatggacttcccttgggggtaacctgcccctt
ctctctgctgcaactaatgttttttcttcaacttgggtgaatctgacaattatgtgtcttttaggttactc
tctttagggagtagtcttggcgcattctctgtatttctctgaatttgaatgctggcctgcctcagtagttggggaag
ttctcctgataaatcctgcagagcgttttccaacttgggttccatttctcccatcacttccagttacaccaatcag
atgtagatttggcttttccatagctccatatttcttggaggcttggttcatttcttttactcttttctctaa
acttctcttctgcttcaattcattcattgatcttcaatcccttcttccacttgattgaatcagctactgaagct
tgtgcatgtgtcacatagttctcgtgccatgggtttcagctccatcaggtcatttaaggctcttctctatgctgtttt
tctagttagccattcgtctaatgtttttcaagggttttagcttcttggctaaaaggttcaaacatcctcctttag
ctcggaggagttgttattactgatcatctgaagccttcttctcaacttggtaagtcatttctctgctccagctt
gtccattgctggcgaggagctgattccttggaggagaagcgtgctctgatttttagaattttcagcttctctg
ctctggtttctccccatcttattggttttatctaccttgggtcttggatgatgggtgacgtacagatgggggttttgg
gtggatgttcttctcttggtagtttcttctaacagctcaggaccctcagctgcaggctctgttggagtttctgg
aggctcactccagaccctgttggctgggtatcaccagcagaggctgcagaacagcaaatattgcagaacggcaaat
gttgcctcctgatgttctctggaagctcgtctcagaggggcacctggcctgatgaggtgtcagctcggccccac
tgggaggtgctcccagttaggctactcaggggtcaggaaccacttgaagaggcagactgtccattctcagatctc
atattccatgctgggaggaccctactcttttcaaagctgtcagacagggacatttaagtctgcagaagttctgct
gtcttttggctcagctgtgcctgcccctagaggtggagctcagagggcaggcaggcctccttgagctgctgggtggc
tccaccatctcagagcttccgtgcttggttacctactcaagctcagcaatgggtggacaccctccccagcc
tcgctgctgcttgcagttcgatctcagactgctgtgctagcagtgagccaggctccgtgggcatgggaccctccga
gcccaggctgggacataatctcctgggtgtgcccgttttgcataagaccattggaaaagcacagatattagggtgggagtg
tctgattttccaggtaccgtcagcttcccttggctaggaagggaattccccacccttggcttctctg
ggtaggtgatgccccaccctgcttggctcatgctccgtgggttgaaccactgtctgacaagccccagtgagatg
aaccggtagctcagttgaaatgcagaaatcaccctgcttctgcatcactcacgctgggggctgtagactggagct

gttcatatttggccatcttggaaacctccctttccaagtctttattacagagtgggtcactgaaacttcatggaaca
aatggaaattatcttcttaattaatgtcactgtctaccatgtatgggaatttggtaaatattataggtttcaata
acatagtagatagaacattgtcaaacttaaaacttcagtgaaattgtaacagatcccacctgaaattctaaagaaaaca
gaattctaattgaagaggtaaaacttttacagggaaatgtcaactgccatttgggtcctgtaaacaaaaactgtttt
ttaaaaaagtaaaactttaaagtattttcagatgacctcatttgctatccaagtggcttgagtagcttgatgctaa
gactctttgttacagactggagatgtgtgctactggggcagtggtgctctgtgacaaggaggcagaggatgagggc
aaggttcagatgtgactgtgaattctgggtggctctggctatcgggagccttcattgattacagcaaaacagttgctt
tccctagggcaatagtgctctgtcaccagcgtggagttcagtgggcatgatcaatcgctcactgtagcctcaacttc
tagactcaagtaatcctcccacctcagcctcccaagtagctgaaactacaggtgtgaccaccacacctaattttt
ttaatttttaagttttgtagagacatggctcactgtgtgcccaggttgatctcgaattcctgggctctagtgat
cctcccgctcggcctcccaaagtgttgggattacaaaagtggagccactgcacctggccctttgcaaccttcttgac
aatgcattcctttattccctaactggaagttaacttcttctttataaaaattgtatctgtacctttctgggtcat
ttctacctttatattctagttagctatgtcctacctccctcctagggaggaggtaagtaagactggaaagtagact
tcatgtgtgatgaatgaatgaacaaaaggaagtctaacatagggatagtgcaactggatgcaaaataaaaattttt
aaatattgatttgcaagattcattaaggtcaactcctaataagtttgtatcatatattgttaggaacaaatattaat
aacttcttcagcattaccattatctttataggactgtctaaaatgagcagccatctttaaactgtgtttctctg
attacagcctcacaggtaaaacccaaagggtgggaacaaacaagactttttttttctgtatgacctgaattat
ctgtactgttctgttttccaccttggccatagaaaacttagttctaacatgctacaatttttgcagttcttctct
cttagaaaaagaccacattgtctgaaatttcatccatttaagtaatcaagccttaaagttgaaggatcttggctatg
atlaatctagacctacaaagtagtatcttaatggcactccttttagaaagttagggtccaggacacacatagctgca
gtgtccacatttgtgaagctccttcgttgcacagccactctctctctgtggctgatattctaaaactggcaacac
atcctgatggtaaaagcttgggtcaggagacaggtgacctactagctttatggcatttgacaggttacctaacctct
ctgagcataaattgctcctcatctataatggggataataatcccctcctgtctccttgtaaaaaacaaattagatg
acgctgtgaatgttctatagtctcttagacaaatgtaagttatgactacagcaagagtaaaagagcatgttgttat
ggacattcttctcagtgaaatgtctaagacttgtgagtcacacttaaagctaaacttgatactacttctattgattt
cttttagttctatgtactatattgaatttctgacagtggggctatgaaagccttcttagcattttatagatgtgg
ttgaattaatggctgtaagccttaaagcagaattagacagcatcaatgaattttattaagtataataataataat
ctgcttagcaatattacacagcctctttatctttagtgtgataaagagtcacccgaaggtgaaaatgaagaattgt
cctggaagctcttacttaactcttttattttcctaataacagtatataaaaattactattgaaagcttagcagaata
agaaaacaagaagttaaaggctgaaaactacaaattttgtctattatttatttacttcccaagctctctatttga
tctgttagaaaatagagctacacaggaaattgtaggacagttagtagtggtagtggtagtctgtcttttaattatca
agtaaggttttattccattagaggaactcaagaagttggctatggctgataattgctatctgtcaaatccttagag
cagggatccgcaacacccagccatggattgttaccagtccttggcctgttaggaaccagggtgacagtaggaagt
gagcggcggtgagcaaacattgccatctgagctctgtctcttccagatcagcagcagcattgattctcagaa
gcatgagcctgttgtgaaactgcacatgcaaggtataggttgtgtgctccttatgagaatccaattccttatgat
aatttaactgatgatctaaggtggaacctttcatcccaaaacctccacctgctactcccagaccgtggaaaaat
tgtcttccacaaaactggctcctgtgccaaaaaggttgggaccactgccttagagtttataatttgggggttagcac
agcctatatttacctgagaatttcaatgggttactgatctttccaaatgaaaaggcttcttacgaaaaattatcc
aaactgtcttttctttagtttaataaaacctatcagtaagtttttactgagtagtctattacatttttctctgtta
agcattatgggggctcagacatgatccattccctcaaaacttacctttcagctgaaagcttagcagaatgagca
atacggtttaacaattaacaagttagtaggagcagctcggccaacatggtgaaaccctgtctctactaaaaatacaaaa
attagccgggcatgggtgggtgggcgctgtaatcccagctacctcctgctgagggcaggagaattgcttgaaccagga
ggtggagattgcagtgagccgagattgcaccattgactccagcctggcgacagagcaagactctgtcttgggaaa
aaaacaaaaacaaaacagtgagaagggatcaagtactacgtaagatgtaatgtggaattttagggaaggaaggcag
tgatgtctggagtaattagagaaagggcatgcatgatttgatgcttgaactggatcatgaaggataagcaagattt
tggcagcaagtgagaggagagaggagtttgtcagaggaatggaacaagtcaggaggcagtaattgtgtaccgctc
caaggactctgtcctgatcggagcagaagtgatgaagcattgagtagtttgagaaagttagctaagaagggtagggg
cagatgttggagagagttgagtagatcagagagaagacattagatttgagcagatagaacaaaaatgccattgccagtt
ttgtgtaagagaatagtagtttaggggttaccaggaagtggtcatcagagttgaaatggagcagaagagtagtctg
atacagcatcgggacgttgtggtcacaaaatgaggtggtgagggctgagccaagatggtggcagtgggatggataaa
aaggatggccaggcaaaatattttaaaggaaaaatgaacagacatcttactgactggattggaaggctatgcaag
gaaatataattgtcaaaacttgattccaggatttctatcctatgcctgggttgcccaaaatcagggaaccattgtta
gaaaaggttaggagataccactgttccaacaaaaagattgagtttgggtgtgcaccacttaactcaaggccttac
aagtgagtagacagtttagtagaattgcagaagtgccactcagagagcagggttgcaatgtggggttggactttgt
caccattgtgttaattcctaattctatgcagatgctcagcttgaggaatacccatgtttgggctcagaatgaaagc
caagtaatatttactcagatgccaattttcccttgaaatatttctcatggaactgagagaacaataataaaagca
ttaattattttctcataaaagttattataaaaaagataagatcagtgaaaggcagagtaaacactgaagcagctata
gaaaatggatcattcaaaagactcattactgtagtggtgaaaacaaaacaaattttccaacagcttaagctcag
tattttggaccatttttaagtagtttagtgggcacttagtaaatatgtattaaactatagttcatttaattctttt
tttttttttttgagatggagtttactctggtcaccagcgtgcatttttgcttcttagtgatataaaaatgctcg

agtttcacaatgatggtatccttagatttgattaaatagtggtattaaaaatagctgatcacagaaagtctctaccag
 tgtgatgtagatggcctaagattccacatttgcaacttttattgacctaaataagagggtgcccttgggtgttt
 ttatttggactgggaatatttaggagaaagctttttcattcagtggtgtaagtacaatctaccagaaatagaaacccc
 atggacgatctatttctttgatggtacaggactcagaacattcacaagaatttagttgtagcggaatagacatctg
 tattttattcaaaccaattttcccttcttaactctgagaacattgtgcaatctaagcagttctaagcatgtttgctat
 tcgtgcaaagtggagtaaatctaaaagaaatttttttgtgtgttagGGATGGTAATAAAGTCTCTTAGTGGTTGA
 AAATGTATTTCTTACAAAAGTGGAGAACATTTGCTTTTCAATACCAGAGTTTTAGCCATTCTGCATTCTGACCT
 ATTGACTGGAGgtaggttgctttgaattcagtaaaacttcatgggcagaaacacagttccttttctacttatttg
 gatcatgatggccattgcatgtatgtgtctttttgtaagtcctcagaactgagaagtaggaataaaatta
 gggtcagggtggtggtgctactctttgctgctgagaaacacaatgcttcaggtaagtgattctgaagtccttcacc
 acctgacggtaaccttgggttggccataggtatgttttcattttggctgttccatcatttaattggcttctctaga
 gctgcttgttagctagagcctaatttagagtagagcaacctctggcaaacaggaagagatttaatttgggtgatt
 gcttttaaggacttcccaggaaacttcaaaagcagaaaaagaagcactagctgcctattccaaaatgtgtaaaaca
 ccactcagctttttaaagtaggataaactcagagcgcgcgcacacgcgcgcgcacacacacacacacacagaga
 gagaacatctctagtaaaaagaaaagttgagctttcttagctagatgtgtgtattagccagaaaaagccaaggagt
 aagggttttagagaactggaggagataaagtggagctgcatatgggaggcatttgaaatggacttaaatgtctttt
 taatgctgacttttccagtttctccttaccagacacattgttttcatgacattagcccaggcattagacacatcat
 taaaatgaacatgtcaaaaaatgatttctgtttagaaataagcaaaaacattttcagttgtgaccaccagggtgaga
 ataaagaacagtggaattgggagccctgagtttcaacataaactttcttcatgacataaggcaagtcttctatggcc
 tttggttctctacctgtaaaacaggatggctcaatgaaattatcttctctcttggctataatagagtatctctgtg
 ggaagaggaaaaaaagtgcaatttaaggctccttatagttccccactgctgttttattgtgctattcatgccta
 gacatcacatagctagaaggccatcagacccctcaggccactgctgttctgtcacaacattctctgcaaggacca
 gttgctaacttgaaaaaattactattaattacactgttggctgttggcttagtaaacatttatgattttgtgttct
 cgtgacagcatgagcagagatcattaaaaattaaacttacaagctgctaaagtgggaagaaggagaacttgaagcc
 acaatttttgacttgttagaagccatctaactcaggtttatagctagatcttgggggaaacactgcatgtctc
 tggtttatattaaccacatacagcacactactgacactgatttgtgtctggtgacgctggagtttatccaagac
 ataaaaaaccttgaccctgcagaatggcctggaattacaatcagatgggccacatggcatcccgggtgaaagaaagc
 ctaaacagtttctctgtcttggcttctctcctacagTCCACCAGGTGAGAAGAGTGATGACCATCCTTTTTC
 CTTACTATGGTTATTTTCATACTTTGGTTGCATGAAAGGCTGCCCCATGAAAGAAGCAACATCCGAGGACAAGGTGG
 CTTGGCCTACCCAGGTGTGCGGACCCATGGGACTCTGGAGAGCGTGAATGGGCCAAGGCAGGTTCAAGAGGCTTGA
 CATCATTTGGCTGACACTTTTCGAACACGTGATAGAAGAGCTGTTGGATGAGGACCAGAAAGTTCGGCCCAATGAAGAA
 AACAATAAGGACGCGACACTTGTACACGTCCAGGGTGTGCTCAGTAGTCAAGTGCCTTTGGAGCCTCCTCTTCTCTT
 TCTGCTGGAGGAATACAAAAATTACCTAGATGCTGCAACATGTCCATGAGGGTCCGGGCCACTCTGACCTGCC
 GCCGAGGGGAGCTGAGCGTGTGTGACAGTATTAGTGAGTGGGTAACGGCAGCAGACAAAAAGACTGCAGTGGCATG
 TCGGGCGGACGGTACAGTCTTGAAGGGTCCCTGTATCAAAAGGCCAAGTGAAGCAATACTTCTACGAGACCAA
 GTGCAATCCCATGGGTTACACAAAAGAAGGCTGCAGGGGCATAGACAAAAGGCATTGGAAGTCCCAGTCCGAACATA
 CCCAGTTCGTACGTGCGGGCCCTTACCATGGATAGCAAAAAGAGAATTGGCTGGCGATTGATAAGGATAGACACTTCT
 TGTGTATGTACATTGACCATTAAGGGGAAGATAGTGGATTATGTGTATAGATTAGATTATATTGAGACAAAA
 TTATCTATTGTATATACATAACAGGGTAATTATTCTTTAAGAAAAAATAATTTTATGAACTGCATGTGTCA
 ATGAAGTTTATACAGTACAGTGGTTCTACAATCTATTTTATTTGGACATGTCCATGACCAGAAGGAAACAGTCAATTTG
 CGCACAACTTAAAAAGTCTGCATTACATTCCCTTGATAATGTTGTGGTTTGTGGCCTTGCCAAGAAGTGAACATA
 AAAAGTTAAAAAATAATAAATTGCATGCTGCTTTAATTGTGAATTGATAATAAAGTGCCTCTTTGAGAAAACAG
 AAAAAAACACACACACACACAAAAAATTGAACCAAAACATTCCGTTTACATTTTAGACAGTAAGTATCTTCGT
 TCTTGTAGTACTATATCTGTTTTACTGCTTTTAACTCTGATAGCGTTGGAATTAACAATGTCAAGGTGCTGTT
 GTCATGCTTTACTGGCTTAGGGGATGGGGGATGGGGGATATATTTTTGTTGTTTTGTTTTTTCGTTTTGTT
 TGTGTTTTGTTTTTAGTTCCACAGGGAGTAGAGATGGGGAAGAATTCTTACAATATATATTCTGGCTGATAAAGA
 TACATTTGTATGTTGTGAAGATGTTTGCAATATCGATCAGATGACTAGAAAGTGAATAAAAAATTAAGGCAACTGAAC
 AAAAAATGCTCACACTCCACATCCCGTGTGCACCTCCAGGCCCGCTCATTCTTTGGGCGTTGGTCAGAGTAAG
 CTGCTTTTGACGGAAGGACCTATGTTGCTCAGAACACATTCTTTCCCCCCTCCCCCTCTGGTCTCCTCTTTGTTT
 TGTTTAAGGAAGAAAAATCAGTTGCGGCTTCTGAAATATTTTACCAGTGTGTGAACAAGTGAACACATTGTGTCA
 CATCATGACACTCGTATAAGCATGGAGAACAGTGATTTTTTTTTTAGAACAGAAAACAACAAAAAATAACCCCAAAAT
 GAAGATTATTTTTTATGAGGAGTGAACATTTGGGTAATCATGGCTAAGCTTAAAAAAACTCATGGTGAGGCTTAA
 CAATGCTTTGTAAGCAAAAGGTAGAGCCCTGTATCAACCCAGAAACACCTAGATCAGAACAGGAATCCACATTGCCA
 GTGACATGAGACTGAACAGCCAAATGGAGGCTATGTGGAGTTGGCATTGCATTTACCAGCAGTGGGGAGGAATTTG
 TGAGTGGCCATCCCAAGGCTAGGTGGAGGTTGGGCGATGGTATTGAGACATTCCAAAACGAAGGCTCTGAAGGAC
 CTTTCAGAGGTGGCTCTGGAATGACATGTCTAAGCTTGGACCTGTGCTTTAAGTGCCTACATTATCTGACATG
 TGCTCAAGAGGTTCTCGACTGGAGGACCACACTCAAGCCGACTTATGCCACCATCCACCTCTGGATAATTTTGCA
 TAAAATTGGATTAGCCTGGAGCAGGTTGGGAGCCAAATGTGGCATTGTTGATCATGAGATTGATGCAATGAGATAGA
 AGATGTTTGTACTGAAACACTTATTGCTTTGAAACTAGACTTGAGGAAACCAGGGTTTATCTTTTGAAGACTTTTG
 GTAAGGAAAAGGGAACAGGAAAAGAAACCCCAAACTCAGGCCGAATGATCAAGGGGACCCATAGGAAATCTTGTCC

AGAGACAAGACTTCGGGAAGGTGTCTGGACATTCAGAACACCAAGACTTGAAGGTGCCTTGCTCAATGGAAGAGGCC
 AGGACAGAGCTGACAAAATTTGCTCCCCAGTGAAGGCCACAGCAACCTTCTGCCATCCTGTCTGTTCATGGAGAG
 GGTCCCTGCCACCTCTGCCATTTTGGGTAGGAGAAGTCAAGTTGGGAGCCTGAAATAGTGGTTCTTGAAAAAT
 GGATCCCCAGTGAAACTAGAGCTCTAAGCCATTTCAGCCATTTTCACACCTGAAAATGTTAGTGATCACCCTTGG
 ACCAGCATCCTTAAGTATCAGAAAGCCCCAAGCAATTGCTGCATCTTAGTAGGGTGAGGGATAAGCAAAAGAGGATG
 TTCACCATAACCCAGGAATGAAGATACCATCAGCAAAGAATTTCAATTTGTCAGTCTTTCATTTAGAGCTAGTCTT
 TCACAGTACCATCTGAATACCTCTTTGAAAGAAGGAAGACTTTACGTAGTGTAGATTTGTTTTGTGTTGTTTTGAAAA
 TATTATCTTTGTAATTAATTTTAAATATGTAAGGAATGCTTGGAAATATCTGCTGTATGTCAACTTTATGCAGCTCCT
 TTTGAGGGACAAATTTAAAACAACAACCCCATCACAACTTAAAGGATGCAAGGGCCAGATCTGTTAAGTGGT
 TTCATAGGAGACACATCCAGCAATTGTGTGGTCAAGTGGCTCTTTACCCAATAAGATACATCACAGTCACATGCTTG
 ATGGTTTATGTTGACCTAAGATTTATTTGTTAAAATCTCTCTGTTGTGTTTCGTTCTTGTCTGTTTTGTTTTGT
 TTTTAAAGTCTTGTGTGGTCTCTTTGTGGCAGAAGTTCATGCATGGCAGCAGGCCGTGTGCTTTTTTATGGC
 GATTTCCATTGAAAATGTAAGTAAATGTCTGTGGCCTTGTCTCTATGGTAAAGATATTTATCCACATGTAAGAAC
 AAAAAACAATATTTATTGTATTTAGTATATTTATATAATTATGTTATTGAAAAAATGGCATTAAAACCTAACCG
 CATCAGAAGCTATTGTAATAACAAGTCTATTTAAGTGTACTAATTAACATATAATATATGTTTTAAATATAGAAT
 TTTTAAATGTTTTAAATATATTTTCAAAGTACATAA

FIGURA 3

Secuencia antisentido natural (NR_002832.1): SEQ ID NO: 2

>gi|84872122|ref|NR_002832.1| Hebra opuesta de BDNF de Homo sapiens (que no codifica proteína) (BDNFOS), ARN no codificante

CNGCNAAAGATTTCTTCACAGGGTCCTTTAAACTGTCNNTTNTAAGAGGTCCTTCCACTACAGGTAAAGGGAAAT
 TCCCTCTACCTAGGGCCCTCAGGANCCCTTCCCTCTCTCACACGTTTCTTCGACTGCTNNGATTTAAGCATTTCAG
 CTGGCCACGCAACGCAAGAAGCAATAAGAACACAAAACCTACCCTGTTCTCCTCTATCCGTGGCCTTTGCCACC
 ACCCTCCACAACCTAGTTTCAGATTCCTCTCTTTTCTCAAGGGAACGCTCTAAAGCTCTCAAGTCCGTTTTGGCAGGGC
 GATTTTGTAAAGTCTGAANCATTTTCAGTGTGTCTCTCGATCTCAGGCAGCTCAAAGAAAAGATCTGCTGGCTGCGTG
 AAGGTGCATTAGAAAACCTGTGCTACCTTGACAGCTGGGCTGAGCATATGCTCCGGAACCTGCTTCTCTTCCAACAT
 CCTGCACCTCAGGGTTGCACGCTCTGGTTCCCAAGCCCCGGCCGCTGGCTTATGCAATCACTTAGGTACATGCAA
 AAGTATCCCTTCTCCCGGAGCGCCATTGGCCCGGGGAGGTCTCGAGCTCATTACTATGCAGAGAGGAGAGCCGCCAT
 TGGCCAAGAGGAGGACCAGAGGGGCGTGTCTCGGGCAAATTGGATCTCCTAAATTGGATGACCTGGGCTGAAAGA
 CAACTTAAAGACCCCCAGAAAACCTCTGGTTTTATAGATAAGAAAATCTGAGGCTCGAGAGAGAGTGTGTTCTGCCAA
 CATCATCACGGAACAGCTCCTGGGCTCCTGGCTCCTAATCTGTATCGTGTCTGGAACAGCGATGACATCGATCGCG
 AGATCAGGAAGGTGGCCAGTGTGTGCGCCGGCCATCAGGCACCTTCTCTCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTG
 GTTTGCTTCCCTTGTGCCATGATTTGTAATTTCTGAGGCTCCTCAGCCCTGCAGAACCTGGGGTTATAGCCATGT
 GACTGATCTTCGTCCAAGAAATATGTAAGAAAAAAGTGTGAGTTGGCTTTTAGGGCTAGAGCAATGTATCTTAGGCT
 CACTTAAAGGAAGCTGTAGAGATGAGCCCAAGGAGGAAACCAGAAGAGCCCCCAGGCTCACCAGTTGTTTGTGGC
 TCCCTACAAACATGTCAATTCAAGTGGCTAATCTTACAACAGCACAAATTCATCTAACCAGAAAAGAGAAGAGGAGGCT
 CCAAAGGCCTTGACTACTGAGCATCACCTGGACGTGTACAAGTCTGCGTCTTATTGTTTTCTTCATTGGGCCGA
 ACTTCTGGTCTCATCCAACAGCTCTTCTATCACGTGTTGAAAGTGTGAGCCAAATGATGTCAAGCATCTTGAACC
 TGCTTGGGCCATTACGCTCTCCAGAGTCCCATGGGTCGACACCTGGAGATACTCTATATAGCAAAGAAGAA
 AGATAATTTCAATGAGCCATCCTGTTTTACAGTATTGAATATTACCACAAGGTACCAACCATATATGCATACTTAA
 TAGGGTATTTTGTCAAACATATGCATGAAGGTCATTTGTTGAGATGTCAGAACATTTTCCCGTGAGAAGATCTCAT
 TGGGCATTGAAACAGAACCACATGCTCTCAGACCAGCAACCGGACTACCAAATACTCCTCTGTCAACTCTACTTG
 AGTAAGAACGCTTTCAATTAAGGCCTAAGTGTCAACATGCCTTTAAAAAAAATCGTGGTGACACAAAATCTTCTTT
 TTAGCACCCAACAGAATCCCTTCAAAGCCTCGTGGTCTGACACCCTATGCTACGTGACTTGTGACCCATCCATTTGT
 CATGTTCTTCGGGAATGTGGCTAAGGGGTAAGATGTGACTTGAAAAGAAAGGTAGAACAAGATCATCTCAAATTTA
 TTATCAAGGAATAGTTTCAGAAAACGACTTCAGACCACAGAGACAGCAGAACAGATGGTCCGGCATGGATAGAGCATC
 AGACACTCACAGACTGTGCCAACAAGAGCCATCGAGTCAAACAGCCAAAGGAAGGAGGTCATGGAATGGGTCTC
 TCACACCAAACCTGATGCCAGAGGCCCTCAGCATGAATAACAAAGGCAACCAGACCCACAAGCCATACTGAGTGGAT
 ACAAACCTATACCTAGGCTGACATCCCAAATGTGTGTGGCAAGTTAGATGATGATGGCAGAAAAGACAGAACACCT

TGCTTCTGGCCATTGTCAGCTCTTGGAAAGAGAGCACACTTTTAGAGGAGCAGCTGCAAGGAGCCTGAGAACAAA
GGAAATGTCTGTTATGAAAGCCTTCACAGGAAATTCGCAAGTGGCAACGTGGGTCCATTCCGTGTGTGTC
ACTAGA
GCTGGCGCAAGCCCATGGCCATGGTGAGGCAGCGTTTCCACTGGAACATACTGATACCTGCACCAACTCT
TGCAAC
TGTGCAGTGTCCCCTGCAAACTACGGATGGGGTAAAAGACTGCTCACCTCCTATTTCTCATCTAATCTC
ACACAC
TCTGTTTGATGAGGCTATGGAGAAACAGGTCTTCTCATACTAAAGGTGGGAGTACAAACAATTCAAGCC
CTGTGC
AGGACAATTAGGCAATACCTATCAAAATTATACATGATTTTCTGCTGACCCAGCAATCCACTTTTGGGA
ATAAT
TGACAGATATAGGTGCATATGTACAAAATGATGGAAAGCTCTCTGGTATATATTAGTAAGTGATAAA
ACAAGGTGTG
TGTATATATGGCTACTACCTTTTGTTTTAAAAATGGGGGAAAAATGGTGGAGCTTGCGGTGAGCCG
AGATCGTGCCAC
TGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAACAGGGTGGGGTGGGGGGAA
ATAATAGTA
CATACTCATATTTACCTGTATCTATATAAAACACACTATCAAGGATTCACAAGAACTAATACAA
AATGATCCCCCTTA
TAGATGGTATGTATTGGGGGATACTGAGGTGAGCAGGGTATAAGTGGGGCAAGACTTTTCAGTGT
AAACTTCTTTTA
AATTTATTTGATTTTGAATAATGTAAATTAAGTCAATAATTAATTAATAAATAACCAATTTATTA
ACAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAATA

FIGURA 4

ID de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:3	C**T**T**G**A**A**T**T**G**T**T**T**+G**+T**+A
SEQ ID NO:4	A**+G**+T**T**G**C**A**A**G**A**G**T**+T**+G**+G
SEQ ID NO:5	A**+T**+C**T**G**T**T**C**T**G**C**T**+G**+T**+C
SEQ ID NO:6	C**+A**+T**A**T**T**C**T**T**G**G**A**+C**+G**+A
SEQ ID NO:7	T**+G**+T**G**C**T**G**T**T**G**T**A**+A**+G**+A
SEQ ID NO:8	T**+G**+A**C**A**G**A**G**G**A**G**T**+A**+T**+T

FIGURA 5

ID de secuencia	Secuencia
SEQ ID NO:9	GCACACCTGGAGATACTCTATTATA
SEQ ID NO:10	CCTGCAGAATGGCCTGGAATTACAA