

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 471**

21 Número de solicitud: 201430504

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.04.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

06.10.2015

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE
(100.0%)**

**Avda. de Córdoba, s/n, Hospital Universitario 12
de Octubre, Centro de actividades ambulatorias,
6ª Planta Bloque D
28041 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**PAZ ARTAL, Estela y
MANCEBO SIERRA, Esther**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **ARN de interferencia para el tratamiento del Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune de tipo Ia**

57 Resumen:

ARN de interferencia para el tratamiento del Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune de tipo Ia.

La presente invención se refiere a un ARN de interferencia específico del alelo mutado del gen FAS y su uso en el tratamiento del Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune de tipo Ia.

ES 2 547 471 A1

ARN de interferencia para el tratamiento del Síndrome Linfoproliferativo
Autoinmune de tipo Ia

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a un ARN de interferencia específico del alelo mutado del gen FAS y su uso en el tratamiento del Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune de tipo Ia. Por lo tanto, la presente invención pertenece al campo de la medicina, en concreto del tratamiento terapéutico de enfermedades autoinmunes.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15

El Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLPA) es una patología congénita de la apoptosis (muerte celular programada) linfocitaria que causa linfoproliferación y autoinmunidad. La enfermedad se caracteriza por linfadenopatía crónica, esplenomegalia, citopenias autoinmunes y una expansión anómala de linfocitos T $\alpha\beta$ + CD3+CD4–CD8– ($\alpha\beta$ dobles negativos).

20

Los individuos con SLPA tienen defectos en la vía de apoptosis mediada por el receptor FAS, cuyo funcionamiento es crítico para mantener la tolerancia y homeostasis linfocitarias. Aproximadamente dos tercios de los pacientes con SLPA (correspondientes al denominado tipo Ia) presentan una mutación germinal en heterocigosis en el gen de *FAS* (también llamado *APO1*, *TNFRSF6* ó *CD95*) que suele localizarse en la porción intracelular del receptor FAS conocida como dominio de muerte (DD). La correcta función de este dominio proteico es necesaria para el reclutamiento de la molécula intracelular FADD y la activación de las caspasas que conduce finalmente a la apoptosis. Las mutaciones que afectan al DD actúan en forma “dominante negativa”. Esto significa que en individuos heterocigotos y por tanto con un 50% de proteína FAS anómala, las cadenas aberrantes de FAS se incorporan en la mayoría de los homotrímeros FAS (se calcula que esto sucede en 7 de 8 homotrímeros) impidiendo la transducción de una señal de muerte eficaz en los linfocitos. Las mutaciones en el DD se asocian con formas severas de la enfermedad y alta penetrancia de los síntomas clínicos. Además, los pacientes con mutaciones germinales en FAS presentan un riesgo relativo 51 veces superior que la población normal de sufrir linfoma de Hodgkin y 14 veces superior de sufrir linfomas no Hodgkin.

35

Aunque en los últimos años ha mejorado considerablemente, el tratamiento del SLPA no es curativo ni completamente satisfactorio. El cuidado de los pacientes con SLPA incluye consejo genético familiar, vigilancia ante la potencial aparición de linfomas y fármacos inmunosupresores dirigidos principalmente al tratamiento de las citopenias.

5 La prednisona (sola o en combinación con inmunoglobulinas intravenosas) suele administrarse al principio pero sus importantes efectos secundarios, especialmente en niños, impiden un uso continuado. Los pacientes refractarios a corticoides con importantes esplenomegalia e hiperesplenismo pueden beneficiarse del tratamiento con micofenolato mofetilo (MMF), pero este fármaco no mejora la linfoproliferación ni
10 reduce el número de células dobles negativas y presenta toxicidades como diarrea y neutropenia. La terapia con sirolimus (Rapamicina), particularmente útil en la recuperación de las células sanguíneas y la reducción de la linfoproliferación, las adenomegalias, esplenomegalia y células dobles negativas, puede causar hipercolesterolemia, hipertensión y alteración de las funciones hepática y renal, y
15 requiere la cuantificación regular de niveles sanguíneos para asegurar márgenes terapéuticos adecuados. Por último, la administración de rituximab y la esplenectomía se asocian con toxicidades específicas en el SLPA que incluyen profundas y duraderas hipogammaglobulinemias y sepsis mortales respectivamente, por lo que sólo se utilizan en casos muy seleccionados.

20 La interferencia de RNA es un método ampliamente utilizado para disminuir la abundancia de productos génicos específicos. Este proceso de silenciamiento de la expresión génica, post-transcripcional y específico de secuencia, tiene un gran potencial como herramienta terapéutica en enfermedades en las que teóricamente la
25 inhibición génica puede ser beneficiosa.

Desde hace algún tiempo se viene demostrando la posibilidad de sintetizar moléculas de siRNA capaces de suprimir la expresión del alelo patogénico con preservación de la expresión del alelo normal (*wild type*) por discriminación de un solo nucleótido.

30

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto que la inhibición alelo-específica de las mutaciones en el gen FAS con siRNAs provoca la recuperación de la actividad
35 funcional de la vía FAS lo que deriva en la muerte celular por apoptosis. Por lo tanto, el proceso de silenciamiento específico en mutaciones del gen FAS permite el

tratamiento de sujetos que padecen el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLPA) de tipo Ia de herencia dominante negativa.

Para ello, se diseñaron varios siRNA dirigidos a mutaciones en el gen FAS en dos
5 pacientes que padecen SLPA de tipo Ia y se transfectaron los fibroblastos de dichos
pacientes con los siRNA diseñados. El tratamiento de los fibroblastos de los pacientes
con sus siRNA específicos de los alelos FAS mutados permitió la recuperación de la
apoptosis celular, no afectando a fibroblastos control, lo que demostró que
efectivamente el silenciamiento afecta sólo a las formas mutadas de FAS y preserva la
10 expresión de moléculas FAS *wild type* (silvestres). Sin querer estar vinculados a
ninguna teoría, se piensa que esto ocurre por generar mayor cantidad de trímeros
FAS funcionales en la superficie celular, logrando incrementar la activación de las
caspasas y la desorganización de las mitocondrias, pasos previos a la muerte celular
por apoptosis. Por lo tanto, tras la transfección de los fibroblastos se observó una
15 recuperación significativa de la muerte celular respecto a células no transfectadas o
células transfectadas con un siRNA control (ver Ejemplo 1).

ARN de interferencia de la invención

20 La presente invención requiere el diseño de un ARN de interferencia (ARNi o en
inglés, iRNA) dirigido a un alelo mutado del gen FAS que, al entrar en la célula,
suprime la expresión del alelo patógeno, por lo que la proporción de proteína del alelo
silvestre (*wild type*) se ve aumentada, permitiendo que la vía de señalización de FAS
sea funcional.

25 Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se relaciona con un ARNi específico
de un alelo mutado del gen FAS asociado al SLPA de tipo Ia, de aquí en adelante
“ARNi de la invención”, en el que dicho ARNi inhibe la expresión de dicho alelo
mutado.

30 En la presente invención se entiende por “ARN de interferencia” (ARNi o iRNA) a la
molécula de ácido ribonucleico, de entre 15 a 40 nucleótidos, que suprime la
expresión de genes específicos mediante mecanismos conocidos globalmente como
ribointerferencia o interferencia por ARN. De entre los tipos de ARNi que existen en el
35 estado de la técnica, los más adecuados para poner en práctica la presente invención

son los siARN y shARN. En una realización particular, el ARNi es un siARN o un shARN.

El acrónimo siARN proviene del inglés *small interfering RNA*: en español, ARN interferente pequeño. Son moléculas de ARN bicatenario perfectamente complementarias con 2 nucleótidos desemparejados en cada extremo 3'. Cada hebra de ARN tiene un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo (-OH) 3'.

Un shARN es una pequeña horquilla de ARN codificada por un ADN, de tal forma que cuando se realiza la transcripción (generación del ARN) se genera un ARN auto-complementario que se pliega como una horquilla y que será reconocido por la maquinaria celular como un iARN. Se puede, por tanto, utilizar para silenciar la expresión del gen diana a través de la interferencia de ARN. La expresión de shRNA en las células se realiza típicamente mediante la introducción de plásmidos, que codifican para la formación de shARN, a través de vectores virales.

En el contexto de la presente invención, el ARNi tiene que ser diseñado para que sea específico del alelo mutado del gen FAS.

En la presente invención se entiende por "alelo" a la forma alternativa de un gen que se halla en el mismo locus de cromosomas homólogos. Cada individuo presenta dos alelos para un mismo gen, cada uno procedente de uno de sus progenitores. Se entiende por "alelo mutado" al alelo que presenta un cambio en su secuencia de nucleótidos desencadenante de la enfermedad.

En la presente invención se entiende por "alelo mutado del gen FAS" a aquel cambio en la secuencia de nucleótidos del gen FAS que afecta únicamente a uno de sus alelos y que se asocia con el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLPA) de tipo la.

El gen FAS (también llamado APO1, TNFRSF6 o CD95) codifica para la proteína FAS o receptor FAS, una proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado. El receptor FAS es un receptor de muerte sobre la superficie de las células, es decir, su activación por el ligando correspondiente conduce a la muerte celular programada o apoptosis. El gen FAS (NCBI, GeneID: 335) está localizado en humanos en el brazo largo de cromosoma 10 (10q24.1). La

secuencia de nucleótidos del gen FAS se muestra en la SEQ ID NO: 1 (NCBI, número de acceso NG_009089, versión NG_009089.2 GI:329299085).

5 Alelos mutados del gen FAS que pueden emplearse en el diseño de los ARNi de la invención incluyen, sin limitar a, mutaciones en los exones 7, 8 o 9 del gen FAS.

10 Ejemplos de mutaciones en el exón 7 del gen FAS incluyen, sin limitar a, K181(del-11), T182I, E195X-fs(-1), S196I-fs*7 (dup+1), y L199X (fs indica cambio de la pauta de lectura, del inglés *frameship*; del indica delección de nucleótidos; dup indica duplicación).

Ejemplos de mutaciones en el exón 8 del gen FAS incluyen, sin limitar a, N207X (del-8), L208X (del-2), variación del splicing (del codones 202-210) y I206X fs(-1).

15 Ejemplos de mutaciones en el exón 9 del gen FAS incluyen, sin limitar a, T225P, Q257X, D253 (fs -2), L290 (del 29 últimos aminoácidos), K230X fs(+1), D244Y, R234X, D244V, D244G, D244Y, T254I, S214 fs(+2), S227 fs(+4), V233L, R234P, G237D, G237S, I243R, T254K, E256K, W265 fs, K280 fs(-1), R234Q, I246S, D244N, V204 (del-2), D212X (del-5), Y275S, D253Y, K235R, N264H, D244V, N248K, E256K,
20 L262F, K283N, L213 fs(-20), A241T, N250S, V251I, N239D, Y216X, E240V, D244N, D244H, fs exón 9 (+1 codon 285), V229A, 284 (inserción +1) fs, T254A, Q260X, Q260N, Q260N, N239D, E240G, D244V, R263H, D210G, A221G, N239S, H266L, K271M, D276G, I279V, I302V, T203P, A285 fs(+1), Q228X, N250S, D244N y Q260X.

25 Aunque cualquiera de las mutaciones arriba indicadas puede emplearse en el diseño de los ARNi de la invención, en una realización particular, el alelo mutado del gen FAS asociado al SLPA de tipo Ia se selecciona del grupo que consiste en:

- la mutación c.797T>G de la secuencia de nucleótidos con número de acceso a GeneBank AY495076 (SEQ ID NO: 2), o
- 30 - la mutación c.827dupA de la secuencia de nucleótidos con número de acceso a GeneBank EU481974.2 (SEQ ID NO: 3)

35 Como se ha indicado previamente, los ARNi pueden ser de varios tipos, incluyendo tanto ARNi de cadena sencilla como de doble cadena. Así, en una realización particular, el ARNi comprende:

- una primera cadena sentido que comprende una longitud de entre 16 y 30 nucleótidos homólogos a la región del gen FAS que comprende el alelo mutado y la posición nucleotídica mutada de dicho alelo, y
- una segunda cadena antisentido que comprende de entre 16 y 30 nucleótidos complementarios a la primera cadena.

En otra realización más particular, la primera cadena sentido comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 dirigida al alelo mutado del gen FAS portador de la mutación c.979T>G, o la secuencia SEQ ID NO: 5 dirigida al alelo mutado del gen FAS portador de la mutación c.827dupA.

Como entiende el experto en la materia, el ARNi puede sintetizarse químicamente o mediante la expresión del ADN correspondiente en una célula adecuada. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNi de la invención, de aquí en adelante, secuencia de nucleótidos de la invención, la cual, opcionalmente, puede estar incluida dentro de un vector o dentro de una célula.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención.

La obtención de dicho vector puede obtenerse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En general, un vector comprende, además de la secuencia de nucleótidos de la invención, un promotor que dirige su transcripción (por ejemplo, U6, H1, etc.) al que está operativamente enlazado, y otras secuencias necesarias o apropiadas que controlan y regulan dicha transcripción. Ejemplos de vectores de expresión apropiados pueden seleccionarse de acuerdo con las condiciones y necesidades de cada caso. La elección del vector dependerá de la célula huésped y del tipo de uso que se quiera realizar. Por ejemplo, dicho vector puede ser un vector viral (adenovirus, virus asociados a los adenovirus así como retrovirus y, en particular, lentivirus) o no viral (pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAXI, pZeoSV2, pCI, pSVL and pKSV-10, pBPV-1, pML2d y pTDIT). Vectores adecuados para alojar la secuencia de nucleótidos de la invención incluyen un plásmido o un vector que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra o no en el genoma

de dicha célula. Dicho vector puede obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia.

5 Así, en una realización particular, el vector es un vector viral, un vector retroviral, un cassette de expresión o un plásmido y que, opcionalmente comprende un promotor ARN polimerasa III o ARN polimerasa II.

10 Como entiende el experto en la materia, los vectores de la invención pueden usarse alternativamente para transformar, transfectar o infectar células, preferentemente células de mamífero que incluyen células humanas, por ejemplo, *ex vivo*, y, posteriormente implantarlas al cuerpo humano o animal para obtener el efecto terapéutico deseado.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una célula que comprende la secuencia de nucleótidos de la invención o un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos.

15 Prácticamente cualquier célula huésped (tanto eucariota como procariota) puede usarse en el contexto de la presente invención (por ejemplo células animales, levaduras, células vegetales, etc.) y obtenerse mediante procedimientos convencionales conocidos por expertos en la materia.

20 Por otro lado, dentro del ámbito de la presente invención, también se contemplan como aspectos inventivos adicionales el vector y la célula que comprenden el ARNi de la invención.

25 Una vez que se ha diseñado el ARNi dirigido de forma específica al alelo mutado del gen FAS, el ARNi puede formar parte de una composición formulada de forma adecuada para su administración a un sujeto.

30 Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición, de aquí en adelante "composición farmacéutica de la invención", que comprende una cantidad efectiva del ARNi de la invención, una secuencia de nucleótidos, un vector o una célula según la presente invención, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En la presente invención se entiende por “composición farmacéutica” o “medicamento” a toda preparación o forma farmacéutica, cuya fórmula de composición expresada en unidades del sistema internacional, está constituida por una sustancia o mezcla de sustancias, con peso, volumen y porcentajes constantes, elaborada en laboratorios farmacéuticos legalmente establecidos, envasada o etiquetada para ser distribuida y comercializada como eficaz para diagnóstico, tratamiento, mitigación y profilaxis de una enfermedad, anomalía física o síntoma, o el restablecimiento, corrección o modificación del equilibrio de las funciones orgánicas de los seres humanos y de los animales.

10

En la presente invención se entiende por “vehículo farmacéuticamente aceptable” a aquella sustancia/s inerte de naturaleza acuosa u oleosa, que se emplea/n en las formulaciones farmacéuticas para diluir el principio activo hasta un volumen o peso determinado, que pueden ir acompañados de otros excipientes. Dichos excipientes son sustancias que modifican alguna de las características del principio activo en el producto final denominado forma farmacéutica.

15

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas. La composición terapéutica puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida, por ejemplo, por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

20

25

Asimismo, la composición farmacéutica puede comprender otros compuestos farmacéuticos útiles para el tratamiento de la SLPA de tipo Ia. Ejemplos de compuestos farmacéuticos útiles en el tratamiento de la SLPA de tipo Ia incluyen, pero no se limitan a, inmunosupresores como corticosteroides, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus y micofenolato-mofetil.

30

La elaboración de la composición farmacéutica puede llevarse por cualquiera de los métodos descritos en el estado de la técnica, y además de los ARNi específicos de los alelos mutados del gen FAS, puede comprender un adyuvante y vehículos farmacéuticamente aceptables para su administración.

35

Usos y métodos del ARNi de la invención

Tal como se ha explicado al inicio de la presente descripción, la inhibición alelo-específica de las mutaciones FAS con siRNAs específicos provoca la recuperación de la capacidad de morir por apoptosis de células portadoras de dichas mutaciones, lo que resulta de utilidad en el tratamiento de sujetos con SLPA de tipo Ia.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del ARNi, una secuencia de nucleótidos, un vector o una célula según la presente invención, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento del SLPA de tipo Ia o alternativamente, se refiere al ARNi, una secuencia de nucleótidos, un vector o una célula según la presente invención, para su uso en el tratamiento del SLPA de tipo Ia.

Las características de la composición farmacéutica y la forma de obtenerla han sido descritas previamente en la presente descripción y son aplicables al presente aspecto inventivo.

En la presente invención se entiende por “tratamiento” al conjunto de medios que se utilizar para tratar, aliviar o curar una enfermedad, en particular, el Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLPA) de tipo Ia.

En la presente invención, la enfermedad a tratar es el SLPA de tipo Ia. El SLPA de tipo Ia es una enfermedad congénita y hereditaria, causada por una mutación en el gen que codifica la proteína FAS, lo que provoca una alteración de los mecanismos naturales de apoptosis de linfocitos, causando la supervivencia anormalmente alta de los mismos. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluyen linfadenopatías, hepatoesplenomegalia con o sin hiperesplenismo, y enfermedades autoinmunes (anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, neutropenia autoinmune, glomerulonefritis, hepatitis autoinmune, síndrome de Guillen-Barre, uveitis, entre otras), que mayoritariamente afectan a células sanguíneas. Adicionalmente los pacientes presentan un riesgo elevado de sufrir linfomas (Hodgkin y no-Hodgkin), carcinomas (tiroideos, pulmonares, piel, lengua, hígado) y múltiples lesiones neoplásicas (adenomas, gliomas).

Las manifestaciones linfoproliferativas no malignas frecuentemente mejoran con la edad, mientras que los eventos autoinmunes no suelen remitir con el paso del tiempo. Por otro lado, el riesgo a desarrollar linfomas permanece elevado durante toda la vida del paciente.

5

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar si un ARNi es útil en el tratamiento de un sujeto que padece SLPA de tipo Ia, de aquí en adelante “método de la invención”, que comprende:

- a) poner en contacto un ARNi específico de una mutación en un alelo del gen FAS con un cultivo celular procedente de dicho sujeto, y
- b) evaluar la apoptosis celular en el cultivo celular procedente del sujeto, en donde un incremento de la apoptosis estadísticamente significativo en el cultivo celular procedente del sujeto con respecto a la apoptosis de un cultivo celular procedente del mismo sujeto tratado con un ARNi control negativo, es indicativo de que el ARNi específico de una mutación en un alelo del gen FAS, es útil en el tratamiento del sujeto que padece SLPA de tipo Ia.

10

15

A efectos de la presente invención, el término “ARNi control negativo” se refiere a un ARNi no interferente del RNA.

20

En una realización preferida del método de la invención, previamente a la etapa a), se determina en una muestra biológica del sujeto, la mutación en el alelo del gen FAS y se diseña un ARNi específico para dicha mutación.

25

En la presente invención se entiende por “sujeto” a un ser humano de cualquier raza, sexo o edad.

30

La puesta en práctica del método de la invención puede comprender, adicionalmente, una etapa previa a la etapa a) del método de la invención, para determinar en una muestra biológica del sujeto una mutación en un aleo del gen FAS, por lo que primero es necesario la obtención de la muestra biológica del sujeto que se quiere tratar o para el que se quiere diseñar la terapia personalizada. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas muestras incluyen sangre y muestras de tejidos. Las muestras de sangre pueden ser obtenidas por cualquier método convencional al igual que las muestras de tejidos; a modo ilustrativo dichas muestras de tejidos pueden ser muestras de biopsias obtenidas por resección quirúrgica.

35

A continuación, se procede a procesar la muestra y aislar el ADN genómico y ARN de la misma para después identificar la mutación presente en los alelos del gen FAS. El procesamiento de la muestra y el aislamiento del ADN genómico y ARN es práctica habitual para el experto en la materia y puede llevarse a cabo por cualquiera de los métodos disponibles actualmente para dicho propósito.

Cualquiera de las técnicas que existen actualmente para detectar alelos mutados en un gen puede emplearse en la puesta en práctica del método de la invención. Ejemplos de dichos métodos son la amplificación de las regiones codificantes del gen FAS (utilizando la reacción en cadena de la polimerasa) y posterior secuenciación directa de los productos de PCR. Las variaciones de secuencia detectadas son contrastadas con bases de datos de polimorfismos y las posibles mutaciones se confirman con estudios familiares y poblacionales.

Ejemplos de alelos mutados del gen FAS que pueden detectarse en la etapa a) del método de la invención incluyen, sin limitar a, mutaciones en los exones 7, 8 o 9 del gen FAS. Ejemplos de mutaciones en dichos exones han sido descritos previamente en la presente descripción.

No obstante, en una realización particular, la mutación en el alelo del gen FAS determinada en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en:

- mutación c.979>G de la secuencia de nucleótidos con número de acceso a GeneBank AY495076 (SEQ ID NO: 2), y
- la mutación c.827dupA de la secuencia de nucleótidos con número de acceso a GeneBank EU481974.2 (SEQ ID NO: 3).

Una vez determinada la mutación que presenta el sujeto se procede a diseñar un ARNi específico para la mutación detectada previamente.

Técnicas y procedimientos adecuados para diseñar ARNi han sido descritos previamente en la presente descripción, así como las clases y características de los ARNi. Así, en una realización particular, el ARNi es un siARN o un shARN que, en otra realización todavía más particular, el ARNi comprende

- una primera cadena sentido que comprende una longitud de entre 16 y 30 nucleótidos homólogos a la región del gen FAS que comprende el alelo mutado y la posición nucleotídica mutada de dicho alelo, y

- una segunda cadena antisentido que comprende de entre 16 y 30 nucleótidos complementarios a la primera cadena.

5 En otra realización aún más particular, la cadena sentido del ARNi comprende la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 4, específica del alelo mutado del gen FAS portador de la mutación c.979T>G, o la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 5, específica del alelo mutado del gen FAS portador de la mutación c.827dupA.

10 Tras diseñar el ARNi específico de la mutación, el método de la invención comprende en una etapa a) poner en contacto el ARNi diseñado específicamente para la mutación identificada, con un cultivo celular procedente del sujeto que padece SLPA de tipo Ia. Para poder llevar a cabo esta etapa, es necesario extraer células del sujeto para el que se está diseñando la terapia personalizada y una vez extraídas hacer un cultivo celular el cual, si se desea, puede ser almacenado en las condiciones
15 adecuadas hasta su utilización. No obstante, células adecuadas para la puesta en práctica, validación, del método de la invención son las células del tejido conectivo o fibroblastos. Estas células pueden obtenerse de pequeñas biopsias de piel que se procesan en el laboratorio con el fin de generar pequeños explantes, a partir de los cuales crecen fibroblastos adheridos al plástico de placas o frascos. Los fibroblastos
20 se mantienen en cultivo creciendo durante 2 o 3 meses. Cuando el cultivo está confluyente las células se transfieren para aumentar la superficie disponible para su cultivo. Las células utilizadas en la validación del método no han de exceder los 8 pases.

25 Una vez que se ha puesto en contacto el ARNi diseñado específicamente para la mutación identificada, con el cultivo celular procedente del sujeto, el método de la invención comprende detectar la apoptosis celular [etapa b)].

30 En la presente invención se entiende por "apoptosis" o "apoptosis celular" al proceso celular coordinado, dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de cisteín proteasas denominadas 'caspasas' (en inglés: cysteinyl aspartate-specific proteases) y una compleja cascada de eventos que unen el estímulo inicial con la desaparición definitiva de la célula, es decir, a la muerte celular.

35 Son múltiples los parámetros que pueden emplearse para determinar si una célula está sufriendo apoptosis o muerte celular. Ejemplos de dichos parámetros son:

1) Detección del marcaje con yoduro de propidio. La membrana plasmática de las células que mueren es permeable a ciertos reactivos (colorantes o fluorocromos) y pueden ser teñidas con ellos. Sin embargo, las células vivas excluyen a los denominados “colorantes vitales”, que no penetran a través de la membrana plasmática. Una de estas moléculas es el yoduro de propidio (PI), que tras su unión al DNA incrementa mucho su fluorescencia bajo excitación con luz ultravioleta. Sin permeabilización previa, el PI sólo tiñe células no viables.

2) Un método fundamental en la detección temprana de apoptosis es la valoración de cambios en la localización de la fosfatidilserina (PS) en la membrana plasmática ya que este fosfolípido está normalmente ubicado en la cara interna de la misma. En la apoptosis se pierde la asimetría de la membrana plasmática con la exposición de la PS en la cara externa, precediendo esta translocación a otros eventos apoptóticos. Este proceso se puede cuantificar mediante citometría de flujo utilizando anexina-A5 conjugada con fluorocromos, ya que esta proteína tiene una elevada afinidad por este tipo de fosfolípido. Normalmente se detecta en conjunción con el yoduro de Propidio (IP) permitiendo la distinción de células apoptóticas tempranas (anexina V+/IP-) y apoptóticas tardías (anexina V+/IP+).

3) Cambios morfológicos en la célula, como por ejemplo, pérdida de la unión celular, cambios en las microvellosidades en la organización de la membrana citoplasmática, la aparición de condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, etc. Todo este tipo de cambios se puede detectar mediante microscopía de luz (de campo, de fluorescencia, etc), como mediante microscopía electrónica.

4) Detección de degradación del ADN de forma específica entre nucleosomas. Métodos utilizados para detectar esta degradación es la extracción de ADN con fenol/cloroformo y su precipitación con etanol, o la detección de las proteínas presentes en los nucleosomas (histonas).

5) La fragmentación nucleosomal del DNA genómico se puede determinar por diferentes métodos. Uno de los métodos más utilizados es el ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP Nick End Labeling), test in situ basado en la unión específica de la desoxinucleotidil transferasa terminal a los extremos 3'OH de los fragmentos de DNA e incorporación a dicho extremo de dUTP marcado.

6) Detección de la activación de caspasas, que son una serie de cistein-proteasas que se encuentran en forma de zimógeno en todas las células. La activación de la caspasa 3 se utiliza como marcador temprano de la apoptosis. Puede analizarse el paso de forma pro-caspasa a caspasa activa, que incluye la escisión de parte de la proteína, generándose una proteína activa de menor tamaño, detectable por western-Blot. También puede detectarse la funcionalidad de las caspasas activas proporcionando a las células un sustrato de las caspasas (Ej PARP) que al ser degradado proporcionará una señal colorimétrica, luminiscente o fluorescente.

7) La mitocondria participa activamente en el desencadenamiento de la apoptosis y la despolarización de la membrana mitocondrial es un indicador más de apoptosis. La pérdida de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) es consecuencia de la interrupción del paso de electrones a través de la cadena respiratoria. El DIOC2.3 es un sustrato lipofílico catiónico (3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide) que difunde libremente al citosol celular y se acumula preferentemente en las mitocondrias que tienen potencial de membrana activo, emitiendo fluorescencia; su emisión fluorescente disminuye cuando se produce alteración del potencial de membrana mitocondrial.

Estas y otras técnicas están ampliamente descritas en la literatura científica y están disponibles para el experto en la materia. Ensayos sobre cómo pueden medirse algunos de estos y otros parámetros se describen en los Ejemplos que acompañan a la presente descripción.

Finalmente, tras llevar a cabo cada una de las etapas descritas, podemos concluir si el ARNi diseñado o la terapia es útil en el tratamiento de un sujeto que padece SLPA de tipo Ia, ya que la detección de apoptosis en el cultivo celular es indicativo de que el ARNi diseñado específicamente para la mutación identificada es útil en el tratamiento del sujeto que padece SLPA de tipo Ia.

En la presente invención se entiende que el ARNi o la terapia es útil en el tratamiento de un sujeto que padece SLPA de tipo Ia, cuando la administración del ARNi o la terapia al sujeto, diseñada mediante el método de la invención produce la disminución, atenuación o desaparición del cuadro clínico asociado al SLPA de tipo Ia (linfadenopatías, hepatoesplenomegalia, citopenias y otras manifestaciones autoinmunes).

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Mutaciones en *FAS* y defecto de apoptosis en P1 y P2. **(A)** Estructura del gen *FAS* y mutaciones encontradas en P1 (c.979T>G) y P2 (c.827dupA). SP, péptido señal; TM, dominio transmembrana; DD, dominio de muerte. **(B)** Tras 16 horas de estimulación con AcMo anti-FAS, los fibroblastos de los pacientes permanecen vivos y adheridos a la placa (fibroblastos P1 y P2), mientras que los fibroblastos de controles sanos mueren y pierden la adhesión (fibroblastos Control). **(C)** Tras 16 horas de estimulación con AcMo anti-FAS, la mayoría de los fibroblastos de P1 y P2 permanecen viables (Ioduro de propidio (IP)-negativo, anexina V-negativo), mientras que la mayoría de las células del control son inviables: apoptóticas tardías (IP-positivo, anexina V-positivo) o apoptóticas tempranas (IP-negativo, anexina V-positivo).

Figura 2. Inducción de apoptosis tras silenciación con siRNAs específicos de alelos mutados. 48 horas después de la transfección con siRNAs los fibroblastos fueron tratados con AcMo anti-FAS durante 16 horas y marcados con Anexina V. El porcentaje de apoptosis específica se evaluó por citometría de flujo considerando todas las células anexina-V positivas en P1 **(A)**, P2 **(B)** y sus respectivos controles. Hiperfect indica células que han pasado por el mismo proceso de transfección sin añadir siRNA. **(C)** Experimento representativo (de 8): la apoptosis se induce de forma óptima en fibroblastos del control sano previamente transfectados con siRNA C-NEG, o con los oligonucleótidos diseñados frente a las formas mutadas de *FAS* (siRNAP1-1 o siRNAP2-1), y se reduce de forma importante en fibroblastos transfectados con siRNAWT, por interferencia específica del gen *FAS* normal (*wild type*). La apoptosis es prácticamente nula en células de P1 y P2 tratadas con siRNA C-NEG pero se induce tras el tratamiento con siRNA-P1-1 y siRNA-P2-1 respectivamente. Cuadrantes inferiores izquierdos: células viables (anexina V-, IP-), cuadrantes superiores derechos: células apoptóticas tardías (anexina V+, IP+), cuadrantes inferiores derechos: células apoptóticas tempranas (Anexina-V+, IP -). **(D)** Resultados

agrupados de los 8 experimentos. **(E)** Expresión en membrana de FAS en fibroblastos tras 72 horas de transfección con siRNAs *versus* células sin transfectar.

Figura 3. Digestión de caspasa-8 en los fibroblastos de los pacientes tras silenciamiento específico de FAS mutados y estimulación con AcMo anti-FAS.

Las células del control y pacientes se trataron con los siRNAs indicados, y en los extractos celulares se analizó el procesamiento de caspasa-8 antes (T0) y 300 min tras la inducción de apoptosis con AcMo anti-FAS (T300). Las cabezas de flecha indican la isoforma de procaspasa-8 (p55), las formas de digestión intermedia (p43 y p41) y de digestión final (p18).

Figura 4. Permeabilización de la membrana mitocondrial en la inducción de apoptosis tras el silenciamiento específico. (A) Citometría de flujo de un experimento representativo. Tras transfectar fibroblastos control con siRNA-C-NEG o siRNAs específicos de FAS mutado (siRNA-P1-1 y siRNA-P2-1) la inducción de apoptosis incluye pérdida de potencial de membrana mitocondrial [DiOC2 (3) *low*]. Al transfectarlos con siRNA-WT, que silencia las formas normales de FAS, la pérdida de potencial de membrana es inferior. Tras la estimulación con AcMo anti-FAS, se observa mayor pérdida de potencial de membrana en fibroblastos P1 y P2 tratados con sus siRNA específicos que en los tratados con siRNA-C-NEG. **(B)** Resultados agrupados de los 8 experimentos.

Figura 5. Activación de caspasas 3/7 en fibroblastos de pacientes transfectados con siRNAs alelo-específicos. (A) 48 horas después de la transfección, las células se estimularon con AcMo anti-FAS y tras 5 horas se incubaron con Caspase-Glo® 3/7 Reagent. La intensidad de luminiscencia es proporcional a la actividad de las caspasas 3/7. Cada barra representa medias entre duplicados tras sustraer el valor obtenido en los pocillos “blanco” (sólo medio). **(B)** El sustrato de la caspasa 3, PARP, se digiere tras la silenciación alelo-específica y estimulación con AcMo anti-FAS.

Western blot de PARP (forma completa: p119, producto de digestión: p89) de células no tratadas (T0) o tratadas 300 minutos (T300) con AcMo anti-FAS.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes con SLPA y controles sanos

Se estudiaron dos pacientes con SLPA tipo Ia. P1 es un varón que a los 3 años de edad presentó múltiples adenopatías, hepatosplenomegalia persistente, otitis recurrente, fiebre y exantema generalizado. Las adenopatías y la hepatosplenomegalia fueron disminuyendo gradualmente. En la actualidad el paciente tiene 21 años y no sufre infecciones ni fenómenos autoinmunes. P2 es una mujer, sin síntomas hasta la actualidad, hermana de un varón de 29 años con SLPA y linfoma de Hodgkin en forma de masas abdominales paraaórticas. El padre de ambos falleció a los 58 años por linfoma de Hodgkin. En todos los experimentos se incluyeron muestras de sujetos control sanos.

Caracterización de mutaciones en el gen *FAS*

De sangre periférica se obtuvieron DNA genómico y RNA citoplasmático por procedimientos estándar. Los cebadores diseñados y usados para amplificar y secuenciar el cDNA (secuencia codificante) de *FAS* fueron: F1-5'-cccgcctcagtagcgagttgg-3' [SEQ ID NO: 6] y R1-5'-ccaagttagatctggatccttcc-3' [SEQ ID NO: 7]; F2-5'-cccttgacacaaatgtgaacatgg-3' [SEQ ID NO: 8] y R2-5'-ccaagcagtatttacagccagc-3' [SEQ ID NO: 9]. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización de 94°C-15s, anillamiento a 57°C-30s y extensión a 72°C-80s, 38 ciclos. La secuenciación se realizó en la plataforma ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

siRNAs

Los siRNAs diseñados y sintetizados frente a *FAS* (Sigma-Aldrich Química, Spain) fueron: un siRNA frente a la secuencia normal de *FAS* (siRNA-WT) (Sense siRNA strand: 5'-UAGAUGAGAUCAAGAATGAtt-3' [SEQ ID NO: 10]), tres siRNAs frente a la mutación de *FAS* del primer paciente (c.979T>G): siRNA-P1-1 [SEQ ID NO: 4], siRNA-P1-2 [SEQ ID NO: 12] y siRNA-P1-3 [SEQ ID NO: 14], y tres siRNAs frente a la mutación de *FAS* del segundo paciente, (c.828dupA): siRNA-P2-1 [SEQ ID NO: 5], siRNA-P2-2 [SEQ ID NO: 17] y siRNA-P2-3 [SEQ ID NO: 19] (Tabla 2). Como control negativo se utilizó un siRNA irrelevante, no interferente (siRNA-C-NEG) y como control positivo se utilizó una mezcla de siRNAs que causan muerte celular ("All Stars Negative Control siRNA" and "All Stars Hs Cell Death Control siRNA", respectivamente, Qiagen, Hilden, Germany).

Este último se utilizó para evaluar la eficiencia de la transfección, generando una muerte superior al 90% de las células tanto en fibroblastos de controles como de los pacientes en todos los experimentos realizados.

5 Cultivo de fibroblastos y transfecciones

Los fibroblastos de los pacientes se obtuvieron a partir de muestras de piel de la cara anterior del antebrazo. Los de los controles sanos se obtuvieron a partir de restos de prepucio tras intervenciones de fimosis. Se cultivaron en DMEM (Gibco, Rockville, MD, USA) suplementado con 4.5 g/L de glucosa, 2 mM de glutamina, 10% de suero de ternera fetal, 50 U/mL de penicilina y 50 mg/mL de estreptomicina (Gibco). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂. Todos los experimentos se realizaron con células entre pases 5 y 9.

Los fibroblastos de pacientes y controles se transfectaron en placas de 24 pocillos utilizando Hiperfect Transfection Reagent (Qiagen). En cada pocillo se sembraron 6x10⁴ fibroblastos y se transfectaron con 10 nM de los siRNAs, como concentración final. Tras 48 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se evaluó la apoptosis de las células transfectadas.

20 Inducción de apoptosis y evaluación de la tinción anexina V / ioduro de propidio (IP) por citometría de flujo

Una vez confluentes, los cultivos de fibroblastos se privaron de suero y se mantuvieron en DMEM 24 horas. A continuación se indujo la apoptosis tratando las células con el anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-FAS (clon APO-1-3; 500 ng/ml; ENZO Life Sciences) en presencia de proteína A de *Staphylococcus aureus* (Prot A; 1 µg/ml; Sigma Aldrich) y cicloheximida (CHX; 100 µg/ml; Sigma Aldrich) (Santiago B, et al. J Immunol. 2004, 1;172(1):560-6). Tras tratar los cultivos celulares con tripsina y recuperar por centrifugación tanto las células adheridas como las que se encontraban previamente en suspensión, la muerte celular inducida por el AcMo anti-FAS se analizó por citometría de flujo mediante el “Annexin V- FITC Apoptosis detection kit” (Immunostep, Salamanca, Spain), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La apoptosis específica se calculó con la fórmula: (% apoptosis experimental - % apoptosis espontánea)/(100-% apoptosis espontánea) *100.

35

Expresión de FAS en la superficie celular

Para determinar la expresión de membrana de FAS, los fibroblastos, sin transfectar o tras 48 o 72 horas tras transfección con siRNAs, se trataron con tripsina-EDTA y una vez resuspendidos en PBS con 5% de FCS se incubaron con anticuerpos anti-CD95 o anticuerpos anti-IgG control isotipo (BD Biosciences), ambos marcados con ficoeritrina, durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Tras un lavado con PBS, se analizaron las muestras por citometría de flujo adquiriendo 50.000 células viables de cada una.

10 **Evaluación del potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo**

La inducción de apoptosis se comprobó también determinando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Tras la transfección con los siRNAs y la inducción de la apoptosis, las células se incubaron con 5 nM de ioduro de 3,3'-dietiloxacarbocianina [DiOC2(3)] (Molecular Probes; Invitrogen) durante 15 minutos a 37°C, y el $\Delta\Psi_m$ se determinó por citometría de flujo. El porcentaje de apoptosis específica se calculó con la fórmula: (% de apoptosis experimental - % de apoptosis espontánea) / (100 - % apoptosis espontánea) * 100

Medición de la actividad de la caspasa-3

20 Trascurridas 48 horas desde la transfección, los fibroblastos se sembraron en placas blancas de 96 pocillos (2×10^4 células / pocillo en 100 μ L de medio) y se trataron con AcMo anti-FAS, Proteína A y cicloheximida (ver antes "Inducción de la apoptosis"). Cinco horas más tarde se midió la actividad de la caspasa-3 mediante el ensayo luminogénico Caspase-Glo 3/7 (Promega), añadiendo 100 μ L de sustrato de las caspasas 3/7 por pocillo y evaluando las reacciones en el luminómetro 1 hora más tarde.

Western blotting

48 horas después de la transfección, los fibroblastos se trataron con AcMo anti-FAS, Prot A (proteína A de *Staphylococcus aureus*) y CHX (Cycloheximida), para inducir la apoptosis. A tres tiempos diferentes (tiempo 0, fibroblastos sin AcMo anti-FAS, 60 minutos y 300 minutos), se extrajeron proteínas de 10^6 fibroblastos mediante el buffer RIPA (Bio-Rad Laboratories, Spain) adicionado con 1X Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific Erembodegem) y 0,05M EDTA. Los extractos de proteína (20 μ g) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 4-20% y se transfirieron a filtros de PVDF usando el sistema de transferencia semiseco Trans-Blot (Biorad). Tras

bloquear la membrana 2 horas con 5% de leche en polvo desnatada en TBS-T, las membranas se incubaron durante la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal anti-Caspase-8 (dilución 1/1000, clon 12F5; ENZO Life Science), el policlonal anti-Caspase-3 (dilución 1/1000, Cell Signaling), el monoclonal anti-PARP (dilución 1/1000, clone 46D11; Cell Signalling), y el monoclonal anti-β-Actina (clon AC-74; Sigma-Aldrich Quimica, Spain). Las membranas se lavaron en incubaron durante 1 hora con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a dilución 1/2500 (1/20000 para β-Actina). Las reacciones se revelaron con el sistema ECL (Clarity Western ECL Substrate, Biorad) en un detector ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare).

Análisis estadístico

Las diferencias entre los valores de pacientes y controles se evaluaron estadísticamente con el test t de Student (no pareado, dos colas) y las diferencias entre resultados obtenidos con células sometidas a diferentes tratamientos se evaluaron mediante el test t de Student pareado. Todos los datos se expresan mediante medias y desviaciones estándar (SD).

II. RESULTADOS

Los pacientes presentan las anomalías analíticas del SLPA, mutaciones en FAS y apoptosis defectuosa.

Estudiamos dos pacientes con características clínicas e inmunológicas compatibles con SLPA (Tabla 1).

Tabla 1. Características inmunológicas del paciente 1 y paciente 2.

	Paciente 1	Paciente 2	Valor de referencia
<i>Linfocitos totales (/μl)</i>	2298	2460	1050-4800
<i>Linfocitos T (%)</i>			
CD3+	81	82	61-82
CD3+CD4+	26	49	36-56
CD3+CD8+	32	27	13-31
CD3+TCRαβ+	71	74	55-75
CD3+TCRγδ+	9	3	0-7
TCRαβ+CD4-CD8- (DN)	12	6	0-2

	Paciente 1	Paciente 2	Valor de referencia
Inmunoglobulinas (mg/dl)			
IgG	1950	878	700-1600
IgA	233	64	70-400
IgM	40	105	40-230
Citokinas (pg/ml)			
IL-10	45	6	0-5
sCD25	12968	2844	0-1900
Auto-anticuerpos			
ANA	Positivo	Negativo	
Otros ^a	Negativo	Negativo	
Apoptosis linfocitaria (%)^b	3	4	75-85

^a Otros auto-anticuerpos: anti-cardiolipinas (IgM, IgG e IgA), anti-músculo liso, antimitocondriales, anti-LKM, anti-DNA, anti-β2 glicoproteína.

^b Ensayo realizado con linfocitos aislados, activados con PHA e IL2 y mantenidos *in vitro* una semana. Inducción de la apoptosis con anticuerpo monoclonal anti-FAS (clon APO-1-3).

5

P1 se diagnosticó en la infancia de SLPA tipo Ia. El estudio molecular del gen codificante de la proteína FAS (TNFRSF6) demostró una mutación en heterocigosis (c.979T>G, número de acceso AY495076 en GenBank) en el exón 9, que afecta al dominio de muerte de la proteína (p.Ile246Ser). Su padre es portador de la misma mutación en heterocigosis. P2 presentaba, como su hermano enfermo, la mutación c.827dupA en heterocigosis en el gen de *FAS*, no reportada hasta el momento (número de acceso EU481974.2 en GenBank). Esta mutación, que genera un cambio de serina por isoleucina en la posición 196 de la proteína (p.Ser196Ilefs*7), distorsiona la pauta de lectura y genera un codón stop prematuro en el aminoácido 202, inicio del exón 8, impidiendo la traducción del dominio de muerte de la proteína (exón 9) (Figura 1A). Como se esperaba, los fibroblastos de ambos pacientes mostraban un defecto en

10

15

la apoptosis mediada por FAS (Figuras 1B y 1C), similar al que se había observado previamente en sus linfoblastos (no mostrado).

Recuperación de la apoptosis por interferencia específica de alelos *FAS* mutados: diseño y selección de siRNAs óptimos.

Los siRNAs alelo-específicos se diseñaron como construcciones de 19 nucleótidos más 2 nucleótidos “colgantes” dT (formato 19+2), de forma que el “mismatch” (diferencia) entre los alelos mutado y normal queda situado en el centro del oligonucleótido, según los estudios que han demostrado que esta región de la hebra antisentido del siRNA es la que dirige la rotura del mRNA diana. Tras analizar la secuencia de varios siRNAs posibles, se seleccionaron los oligonucleótidos siRNA-P1-1 y siRNA-P2-1 por ser los que mejor cumplían los criterios asociados con funcionalidad (Reynolds A, et al.. Nat Biotechnol. 2004, 22(3):326-30). A continuación, y de acuerdo a los resultados que demuestran que la discriminación puede mejorarse al añadir en el siRNA “mismatches” secundarios respecto al alelo normal, aunque ello suponga la introducción de un mismatch frente al alelo mutado diana, se diseñaron siRNA-P1-2 y siRNA-P2-2, con mismatches secundarios introducidos inmediatamente a continuación de la posición ocupada por la mutación patogénica. Finalmente se diseñaron otros dos siRNAs, siRNA-P1-3 y siRNA-P2-3, con un mismatch en el extremo 3' de la hebra sentido, con el fin de potenciar su unión al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) (Tabla 2).

Tabla 2. siRNAs diseñados dirigidos a la región de las mutaciones c.979T>G y c.827dupA del gen *FAS*.

FAS mRNA c.979T>G			
Alelo <i>wild type</i>	[SEQ ID NO: 21]	5'- AGCCAAAATAGATGAGATCAAGAATGACAAT GTCCAA - 3'	
Alelo mutado	[SEQ ID NO: 22]	5'- AGCCAAAATAGATGAGAGCAAGAATGACAAT GTCCAA -3'	
Hebra sentido siRNA	[SEQ ID NO: 4]	5' - UAGAUGAGAGCAAGAATGAtt-3	siRNA- P1-1

Hebra antisentido siRNA	[SEQ ID NO: 11]	3'- ttAUCUACUCUC CCUUCUUACU -5'	
Hebra sentido siRNA con 2 <i>missmatch</i>	[SEQ ID NO: 12]	5'- UAGAUGAGAG GAA AGAATGAtt-3'	siRNA-P1-2
Hebra antisentido siRNA	[SEQ ID NO: 13]	3'- ttAUCUACUCUC CUUUCUUACU -5'	
Hebra sentido siRNA modificada en 3'	[SEQ ID NO: 14]	5'- UAGAUGAGAG GCA AGAATG G tt-3'	siRNA-P1-3
Hebra antisentido siRNA	[SEQ ID NO: 15]	3'- ttAUCUACUCUC CCUUCUUACU -5'	
FAS mRNA c.827dupA			
Alelo <i>wild type</i>	[SEQ ID NO: 23]	5'- GAAAACCAAGGTTCTCATGAATCTCCAACCTA AATCC-3	
Alelo mutado	[SEQ ID NO: 24]	5'- GAAAACCAAGGTTCTCATG AA ATCTCCAACCT AAATCC-3	
Hebra sentido siRNA	[SEQ ID NO: 5]	5'- GGUUCUCAUG AAA UCUCCAtt-3'	siRNA-P2-1
Hebra antisentido siRNA	[SEQ ID NO: 16]	3'-ttCCAAGAGUAC UUU AGAGGU-5'	
Hebra sentido siRNA con 2 <i>missmatch</i>	[SEQ ID NO: 17]	5'-GGUUCUCAUG ACA UCUCCAtt-3'	siRNA-P2-2
Hebra antisentido siRNA	[SEQ ID NO: 18]	3'-ttCCAAGAGUAC UGU AGAGGU-5'	
Hebra sentido siRNA modificada en 3'	[SEQ ID NO: 19]	5'-GGUUCUCAUG AAA UCUCC G tt-3'	siRNA-P2-3

Hebra antisentido siRNA	[SEQ ID NO: 20]	3'-ttCCAAGAGUACUUUAGAGGU-5'	
------------------------------------	-----------------	-----------------------------	--

Las letras mayúsculas representan 19 nucleótidos de las secuencias de siRNA de las hebras sentido y antisentido diseñadas para el silenciamiento alelo-específico de cada mutación. Cada siRNA tiene un dinucleótido “colgante” en 3' (letras minúsculas).

Para cada siRNA investigado, el efecto de la apoptosis mediada por FAS se determinó en experimentos duplicados testando distintas concentraciones molares de siRNAs frente a *FAS wild type* y a los alelos mutados (0, 2,5, 5, 10, 15 y 20nM) en fibroblastos de control y pacientes respectivamente. En cada caso, la apoptosis se indujo 24, 48 y 72 horas después de la transfección, y el porcentaje de células apoptóticas (Anexina V +), se midió 16 horas después de la estimulación con AcMo anti-FAS. La mayor y más específica recuperación de la apoptosis se obtuvo a concentración de 10 nM de los siRNAs y estimulación de la apoptosis 48 horas post-transfección. Aunque a concentraciones de siRNAs superiores a 10 nM se observó un incremento en el porcentaje de células apoptóticas en los fibroblastos de los pacientes, la apoptosis de las células control se redujo, indicando silenciamiento del mRNA correspondiente al alelo *wild type* (efecto “fuera de diana”). Cuando se indujo la apoptosis a tiempos más cortos (24 horas después de la transfección) se observó que el efecto del silenciamiento era menos intenso, y a tiempos superiores (72 horas) los efectos del silenciamiento fueron similares que a 48 horas pero el porcentaje de células muertas espontáneamente (sin estimulación con AcMo anti-FAS) se incrementó

De los siRNAs específicos de los alelos mutados que se probaron, los siRNAs modificados siRNA-P1-2, siRNA-P2-2 y siRNA-P2-3, mostraron un efecto discreto en la recuperación de la apoptosis en los fibroblastos de los pacientes. El siRNA-P1-3 consiguió una mayor capacidad apoptótica en las células de P1 pero mostró más efectos fuera de diana, que se manifestaron como un descenso de la capacidad apoptótica en las células control. Los mejores resultados se obtuvieron tras el silenciamiento de los fibroblastos de los pacientes con los siRNAs específicos de secuencia mutada no modificados, siRNA-P1-1 [SEQ ID No.4] y siRNA-P2-1 [SEQ ID No. 5] (Figura 2A y 2B).

Utilizando los siRNAs P1-1 [SEQ ID No.4] y P2-1 [SEQ ID No. 5], el experimento se realizó repetidas veces para comprobar la reproducibilidad en su resultado (n=8, Figura 2C y 2D): tras la transfección con los siRNAs específicos y estimulación de la vía FAS, los fibroblastos de los pacientes recuperaron en buena medida su capacidad de morir por apoptosis.

En los fibroblastos de P1 tratados con siRNA-C-NEG, la apoptosis específica (considerando todas las células Anexina V positivas y calculada según formula indicada en la sección "Pacientes y Métodos") fue $3,4 \pm 4,2$ % (media $\pm$ SD), similar al de las células no tratadas, mientras que ese porcentaje fue del $21,5 \pm 3,7$ % tras el tratamiento con siRNA-P1-1 ($p=0,00004$). Con los fibroblastos de P2 se obtuvieron resultados similares (siRNA-C-NEG= $-0,7 \pm 5$ %; siRNA-P2-1= $19,7 \pm 6,5$ %; $p=0.00003$). El tratamiento de los fibroblastos control con los siRNAs alelo específicos no pareció afectar a su capacidad para la apoptosis [porcentaje de apoptosis específica tras tratamiento con siRNA-C-NEG= $59,5 \pm 14,2$ %; siRNA-P1-1= $65,7 \pm 11,9$ %; siRNA-P2-1= $59,3 \pm 13,9$ %; $p=0,16$ (siRNA-C-NEG versus siRNA-P1-1), $p=0,96$ (siRNA-C-NEG versus siRNA-P2-1)] (Figura 2D). Sin embargo, el tratamiento de los fibroblastos control con siRNA dirigido frente al alelo *wild type* (siRNA-WT) redujo de forma significativa su capacidad de morir por apoptosis tras estimulación de la vía FAS (apoptosis específica tras el tratamiento con siRNA-WT= $28,2 \pm 13,8$ % versus siRNA CNEG= $59,5 \pm 14,2$ %, $p=0,007$)

En las células de P1 tratadas con siRNA-P1-1 [SEQ ID No.4] y posteriormente estimuladas con AcMo anti-FAS, el porcentaje de células en apoptosis temprana específica (células anexina V+ IP-, calculada según fórmula indicada en Pacientes y Métodos) fue $10,5 \pm 6,5$ % (media $\pm$ SD), similar al de células en apoptosis tardía (anexina V+ IP+) $10,4 \pm 7$ %, con valores p respecto a células tratadas con siRNA-C-NEG (apoptosis temprana: $1,7 \pm 1,4$ %; apoptosis tardía: $1,4 \pm 2,7$ %) de 0,009 y 0,005 respectivamente. En células de P2, tratadas con siRNA-P2-1 [SEQ ID No.5], el porcentaje de células apoptóticas tempranas ($11,5 \pm 4,5$ %) fue superior al de apoptóticas tardías ($5,2 \pm 4,3$ %), pero ambos valores fueron también significativamente diferentes a los de células tratadas con siRNA-C-NEG (anexina V+ IP-: $-0,3 \pm 3$ %; anexina V+ IP+: $-0,6 \pm 1,9$ %) ($p=0,00009$ y $p=0,023$ respectivamente).

35

El silenciamiento de los alelos mutados no modifica la expresión de FAS en la superficie celular.

En trabajos previos se ha demostrado que la alteración de la apoptosis producida por la mayor parte de las mutaciones en los dominios extracelulares de FAS se debe a un mecanismo de haploinsuficiencia (baja expresión de FAS en la superficie celular), mientras que en los pacientes con SLPA tipo la con mutaciones intracelulares con interferencia dominante, la cantidad de FAS en la membrana celular suele ser normal. Para comprobar si el silenciamiento de las formas aberrantes de FAS en fibroblastos de P1 y P2 altera la expresión superficial de la proteína, se cuantificaron las moléculas de FAS en la membrana celular por citometría de flujo, antes y después de la interferencia del RNA. Antes de la transfección con siRNAs, el 100% de los fibroblastos de pacientes y controles fue positivo para el marcaje de superficie de FAS, y la densidad de FAS, evaluada por intensidad media de fluorescencia (MFI) fue similar en pacientes y controles (Tabla 2). Transcurridas 48 y 72 horas después de la transfección de fibroblastos de P1 y P2 con siRNA-P1-1 [SEQ ID No.4] y siRNA-P2-1 [SEQ ID No. 5] respectivamente, el 100% de los fibroblastos permaneció positivo para FAS. Tras el silenciamiento alelo específico se observó un leve descenso (no significativo) en la MFI de expresión de FAS (Tabla 3, Figura 2E). Estos resultados sugieren que tras la interferencia de las formas mutadas de FAS no se altera significativamente la expresión de receptores FAS y la recuperación de la apoptosis en los pacientes depende del “rescate” de un número mayor de homotrímeros funcionales de receptores FAS en superficie.

Tabla 3. Expresión de FAS en superficie de fibroblastos.

	Sin transfectar (a)	Hiperfect (b)	siRNA C-NEG (c)	siRNA P1-1 (d)	siRNA P2-1 (e)	p * ¹ (a) vs (d) * ² (a) vs (e)
CONTROL	495±28	470±15	490±6	470±15	491±2	0,2 * ¹ ; 0,9 * ²
P1	495±13	488±21	502±8	474±22		0,2 * ¹
P2	508±14	518±6	523±20		482±8	0,1 * ²

Se muestra la media de MFI de dos experimentos ± SD

*¹, *² valores de p establecidos comparando la MFI de células sin transfectar versus células transfectadas con siRNAs alelo específicos.

Aumento del procesamiento catalítico de caspasa-8

Los primeros eventos tras el desencadenamiento de la apoptosis por estimulación de FAS por AcMo anti-FAS (clon Apo-1-3) incluyen la formación del complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Entre los componentes del multímero DISC se encuentra la procaspasa-8, que tras la activación de la apoptosis se procesa generando varios productos de excisión. Los datos del *western blot* confirmaron que la estimulación de los fibroblastos de pacientes con AcMo anti-FAS tras el tratamiento con los siRNAs alelo-específicos (siRNA-P1-1, siRNA-P2-1) era capaz de desencadenar la señal apoptótica mediada por la activación catalítica de la caspasa 8 (Figura 3).

La inducción de la apoptosis tras el silenciamiento específico incluye la permeabilización de la membrana mitocondrial

Tras la estimulación de FAS, la apoptosis puede proceder por dos vías. En las células denominadas “tipo I” se forman muchos complejos CD95-DISC y gran cantidad de caspasa-8 activa, lo que conduce a una rápida activación de las caspasas terminales 3, 6 y 7. En las células “tipo II”, los niveles de CD95-DISC y caspasa 8 activa son menores y la señal de apoptosis se amplifica mediante la brusca disminución del potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo c y formación del apoptosoma antes de la activación de las caspasas efectoras. No obstante, tras la estimulación de FAS, la activación y participación de las mitocondrias en la apoptosis ocurre tanto en las células tipo I como en las tipo II, y esto se ha demostrado en células murinas y en un importante número de líneas celulares humanas de diferentes tejidos, incluidos fibroblastos. En los experimentos llevados a cabo, 48 horas después de la transfección con los siRNAs se estimuló la vía FAS y se midió el potencial de membrana mitocondrial. Tras inducir apoptosis, las células de los pacientes tratadas con los siRNAs específicos de los alelos mutados presentaron una pérdida significativa de potencial de membrana mitocondrial en comparación con las células de los pacientes tratadas con siRNA-CNEG, mientras que el potencial de membrana mitocondrial permaneció elevado y fue similar en fibroblastos control transfectados con siRNA-C-NEG-, siRNA-P1-1 o siRNA-P2-1, (Figuras 4A y 4B), lo que sugiere que la apoptosis en fibroblastos de pacientes tras la interferencia de los alelos *FAS* mutados incluye la activación de las mitocondrias.

La abolición específica de RNA *FAS* mutados permite la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 tras la estimulación de la vía *FAS* en fibroblastos de pacientes con SLPA tipo Ia.

Los pasos finales en la cascada de apoptosis incluyen la activación de las caspasas efectoras 3 y 7 previa a la fragmentación del ADN. Entre los sustratos de estas caspasas se encuentra PARP (del inglés *poly-ADP-ribose-polymerase*), una enzima nuclear que facilita la reparación del DNA. Cuarenta y ocho horas después de la transfección de fibroblastos de pacientes y controles con siRNAs, la vía *FAS* se estimuló con el AcMo anti-*FAS*. Midiendo la luminiscencia derivada del procesamiento del sustrato que contiene la secuencia DEVD, se pudo observar un incremento de actividad de las caspasas 3 y 7 casi tres veces superior en los fibroblastos de P1 y P2 transfectados con sus siRNAs específicos respecto a células de pacientes no transfectadas o transfectadas con siRNAC- NEG (Figura 5A).

En fibroblastos de pacientes sin transfectar o transfectados con siRNA-C-NEG, la actividad de caspasa 3/7 fue prácticamente nula, similar a la que se detecta en controles normales cuando no se activa la vía *FAS*. En consonancia con estos resultados sobre la activación de las caspasas 3 y 7, los western blots mostraron las bandas correspondientes al procesamiento del sustrato de la Caspasa-3, PARP (Figura 5B).

III. Conclusiones y discusión

La presente invención explora la posibilidad de incrementar la apoptosis en pacientes con SLPA Ia, heterocigotos para las mutaciones dominantes negativas c.979T>G y c.827dupA, mediante un método que interfiriera específicamente la expresión del alelo mutado de *FAS* y preservara la expresión del alelo *wild type*. Se diseñaron tres siRNAs estructuralmente diferentes frente a cada mutación, y se comprobó si, después de tratar los fibroblastos de los pacientes con los siRNAs y estimular la vía *FAS* en ellos, se mejoraba la apoptosis. Los siRNAs específicos para cada mutación que mostraron una recuperación más robusta de la apoptosis (siRNA-P1-1 y siRNA-P2-1) se eligieron para comprobar, en los ejemplos mostrados en la presente invención, que el aumento de la muerte celular en los fibroblastos tratados con siRNAs efectivamente dependía de la activación de los eventos clásicos de la cascada de la apoptosis, que incluyen el procesamiento de las caspasas 8, 3 y 7, la digestión de PARP y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. La ausencia de variación en la expresión de *FAS* en la superficie celular tras el silenciamiento específico (Figura

2E), apoya el concepto de que la recuperación de la apoptosis post-tratamiento se debe a la superación del efecto dominante negativo de las formas mutadas de *FAS*. En base a estas observaciones, se puede concluir que por interferencia de la expresión de las moléculas *FAS* aberrantes, éstas se incorporan en menor grado en los homotrimeros *FAS*, lo que permite una mayor disponibilidad de receptores *FAS* completamente funcionales en la superficie celular.

En los experimentos llevados a cabo, se observó similar capacidad apoptótica en los fibroblastos de control tratados con siRNA-P1-1 y siRNA-P2-1 frente a los tratados con siRNA-C-NEG, lo cual indica ausencia de efectos “fuera de diana” de los siRNAs alelo específicos en relación a la expresión del alelo *wild type*.

Aunque SLPA la es una enfermedad genéticamente heterogénea, el análisis de las mutaciones descritas en la literatura señala la existencia de “puntos calientes” en el gen CD95. De hecho, cambios en arginina-234, ácido aspártico-244 y valina-251 suponen en conjunto el 16% de las mutaciones documentadas en *FAS* (Tauzin S Tauzin S, et al. Cell Mol Life Sci. 2012, 69(8):1261-77). Esto sugiere, de acuerdo a los datos que se presentan en la presente invención, que tres siRNAs diferentes podrían ser suficientes para tratar el 16% de los casos de SLPA la. Es bien conocido que linfomas y tumores de distinto origen histológico presentan una frecuencia considerable de mutaciones en el gen *FAS* que se agrupan sobre todo en los exones 8 y 9 codificantes del dominio intracelular. Tanto en las células malignas como en los linfocitos T doble-negativos de SLPA-la, se ha observado que a la vez que las mutaciones en heterocigosis en el dominio de muerte de *FAS* median resistencia a la apoptosis, la conservación de una copia del alelo *wild type* es suficiente para generar señales no apoptóticas por activación de las vías NF- κ B/MAPK que se traducen en inflamación, carcinogenesis e invasividad (Tauzin S Tauzin S, et al.. Cell Mol Life Sci. 2012, 69(8):1261-77). Estas observaciones sugieren otra potencial aplicación de la silencianción específica de alelos mutados de *FAS* en la personalización de terapia contra el cáncer.

REIVINDICACIONES

1. Uso de

- un ARNi específico de un alelo mutado del gen FAS asociado al síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLPA) de tipo Ia, en el que dicho ARNi inhibe la expresión de dicho alelo mutado,
 - una secuencia de nucleótidos que codifica para dicho ARNi
 - un vector que comprende dicha secuencia de nucleótidos,
 - una célula que comprende dicha secuencia de nucleótidos o dicho vector,
- en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento del Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLPA) de tipo Ia.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho alelo mutado del gen FAS asociado al SLPA de tipo Ia es:

- la mutación c.979>G de la secuencia de nucleótidos con número de acceso a GeneBank AY495076 (SEQ ID NO: 2), o
- la mutación c.827dupA de la secuencia de nucleótidos con número de acceso a GeneBank EU481974.2 (SEQ ID NO: 3).

3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ARNi es un siARN o un shARN.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ARNi comprende:

- una primera cadena sentido que comprende una longitud de entre 16 y 30 nucleótidos homólogos a la región del gen FAS que comprende el alelo mutado y la posición nucleotídica mutada de dicho alelo, y
- una segunda cadena antisentido que comprende de entre 16 y 30 nucleótidos complementarios a la primera cadena.

5. Uso según la reivindicación 4, en el que la primera cadena sentido comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 dirigida al alelo mutado del gen FAS portador de la mutación c.979T>G, o la secuencia SEQ ID NO: 5 dirigida al alelo mutado del gen FAS portador de la mutación c.827dupA.

6. Método *in vitro* para determinar si un ARNi es útil en el tratamiento de un sujeto que padece SLPA de tipo Ia, que comprende:

a) poner en contacto un ARNi específico de una mutación en un alelo del gen FAS con un cultivo celular procedente de dicho sujeto, y

b) evaluar la apoptosis celular en el cultivo celular procedente del sujeto,

5 en donde un incremento de la apoptosis estadísticamente significativo en el cultivo celular procedente del sujeto con respecto a la apoptosis de un cultivo celular procedente del mismo sujeto tratado con un ARNi control negativo, es indicativo de que el ARNi es útil en el tratamiento del sujeto que padece SLPA de tipo Ia.

10 7. Método según la reivindicación 6, en el que previamente a la etapa a), se determina en una muestra biológica del sujeto la mutación en el alelo del gen FAS y se diseña un ARNi específico dicha mutación.

8. Método la reivindicación 6 ó 7, en el que la mutación en el alelo del gen FAS se selecciona del grupo que consiste en:

15 - mutación c.979>G de la secuencia de nucleótidos con número de acceso a GeneBank AY495076 (SEQ ID NO: 2), y
- la mutación c.827dupA de la secuencia de nucleótidos con número de acceso a GeneBank EU481974.2 (SEQ ID NO: 3).

20 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el ARNi es un siARN o un shARN.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el ARNi comprende:

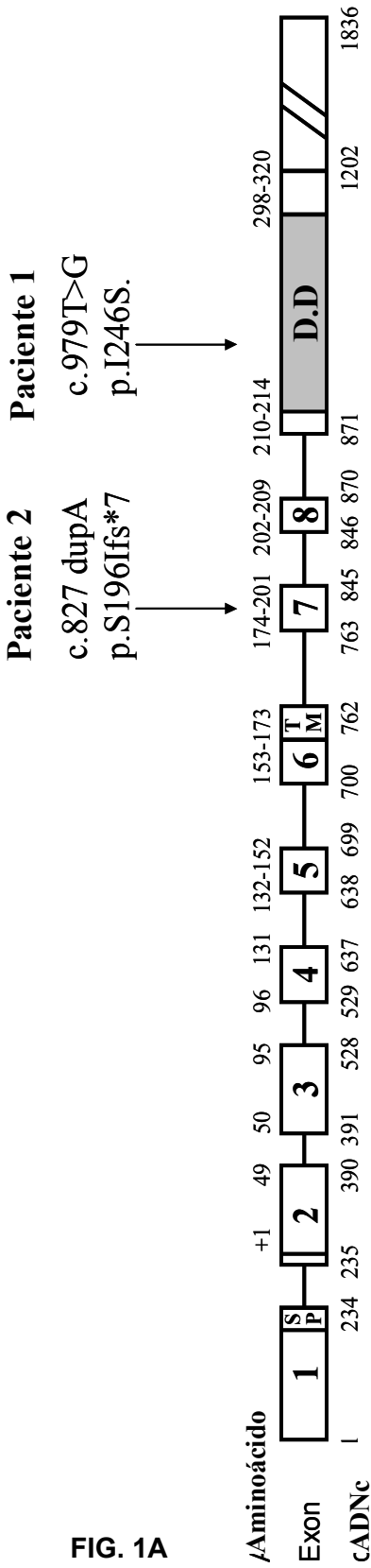
25 - una primera cadena sentido que comprende una longitud de entre 16 y 30 nucleótidos homólogos a la región del gen FAS que comprende el alelo mutado y la posición nucleotídica mutada de dicho alelo, y
- una segunda cadena antisentido que comprende de entre 16 y 30 nucleótidos complementarios a la primera cadena.

30

11. Método según la reivindicación 10, en el que la cadena sentido del ARNi comprende la secuencia SEQ ID NO: 4 específica del alelo mutado del gen FAS portador de la mutación c.979T>G, o la secuencia SEQ ID NO: 5 específica del alelo mutado del gen FAS portador de la mutación c.827dupA.

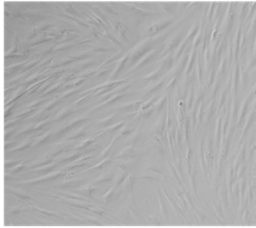
35

A

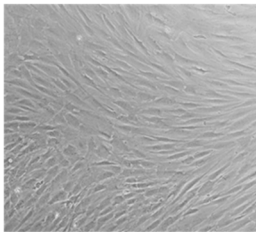


B

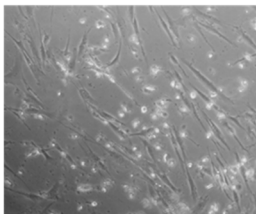
Fibroblastos P1



Fibroblastos P2



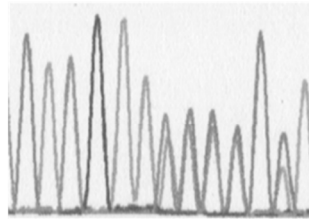
Fibroblastos Control



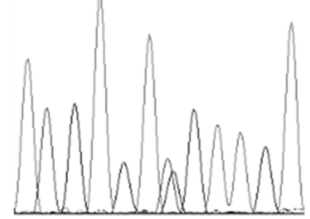
C

Alelo wild type
Alelo mutado

CATGAATCTCCAA
ATCTCCA



ATGAGATCAAGA
G



D

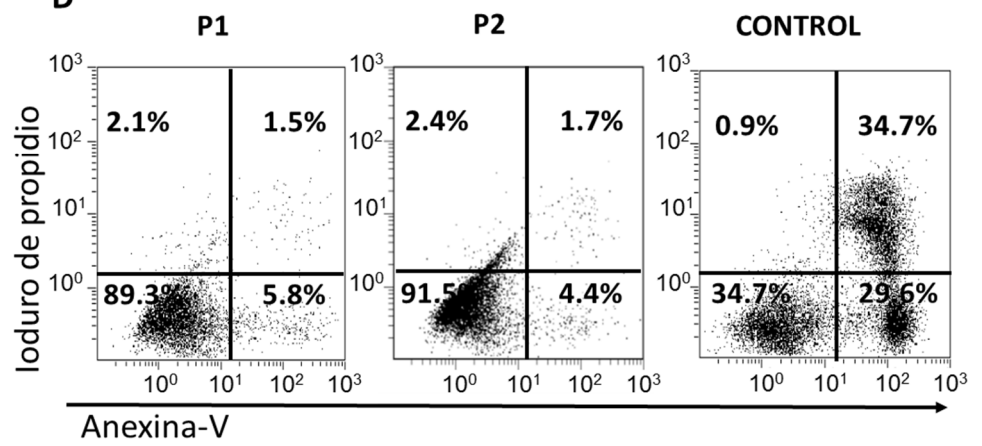


FIG. 1B-D

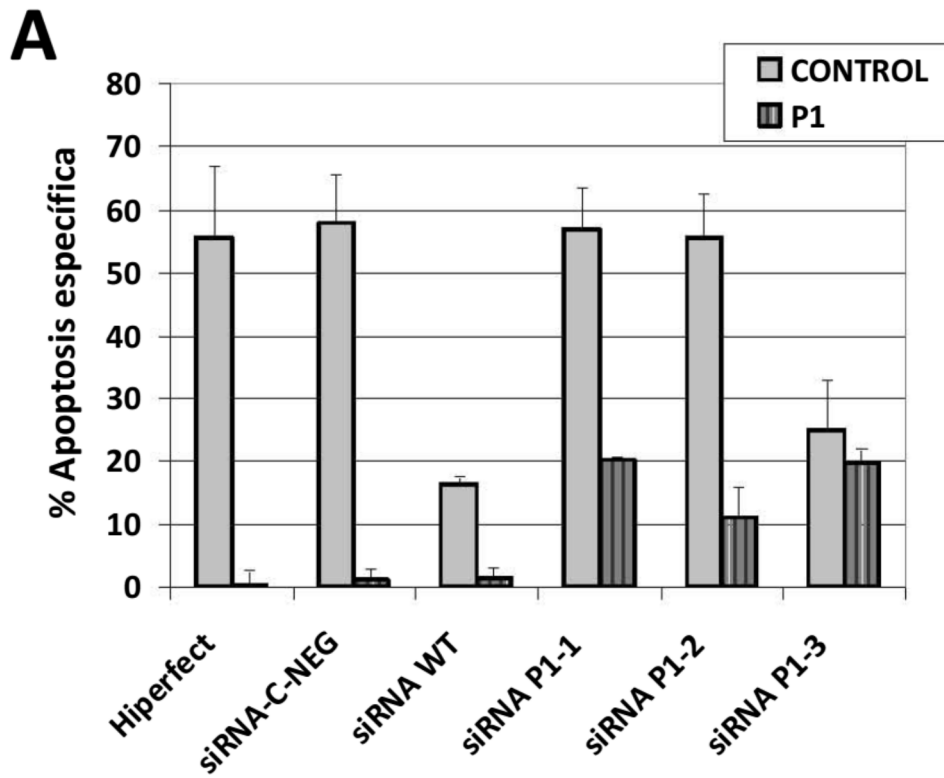


FIG. 2A

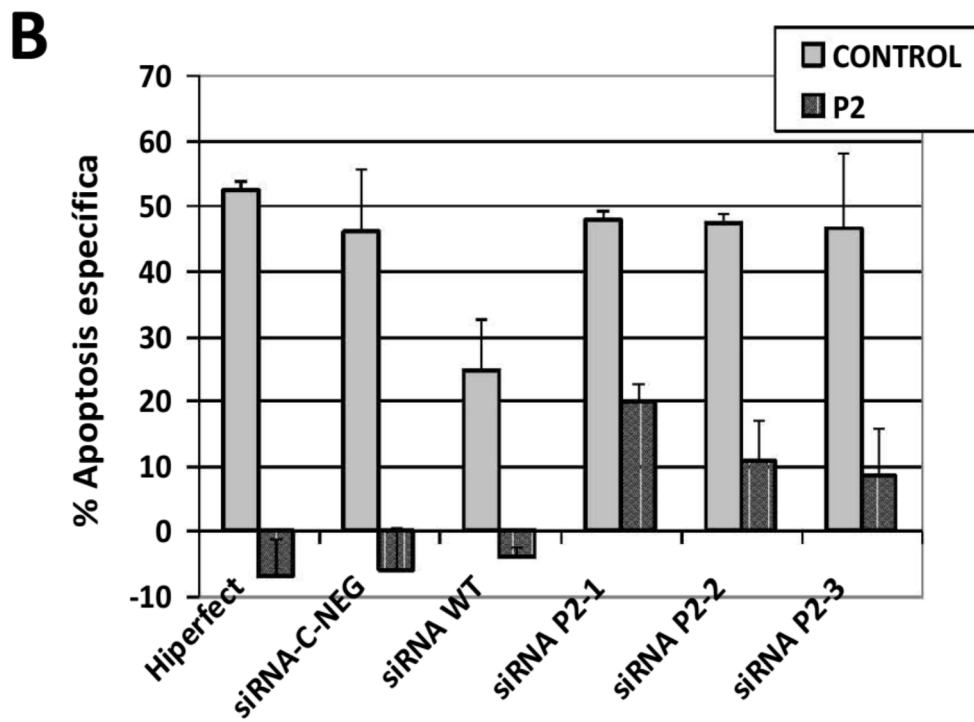


FIG. 2B

C

CONTROL

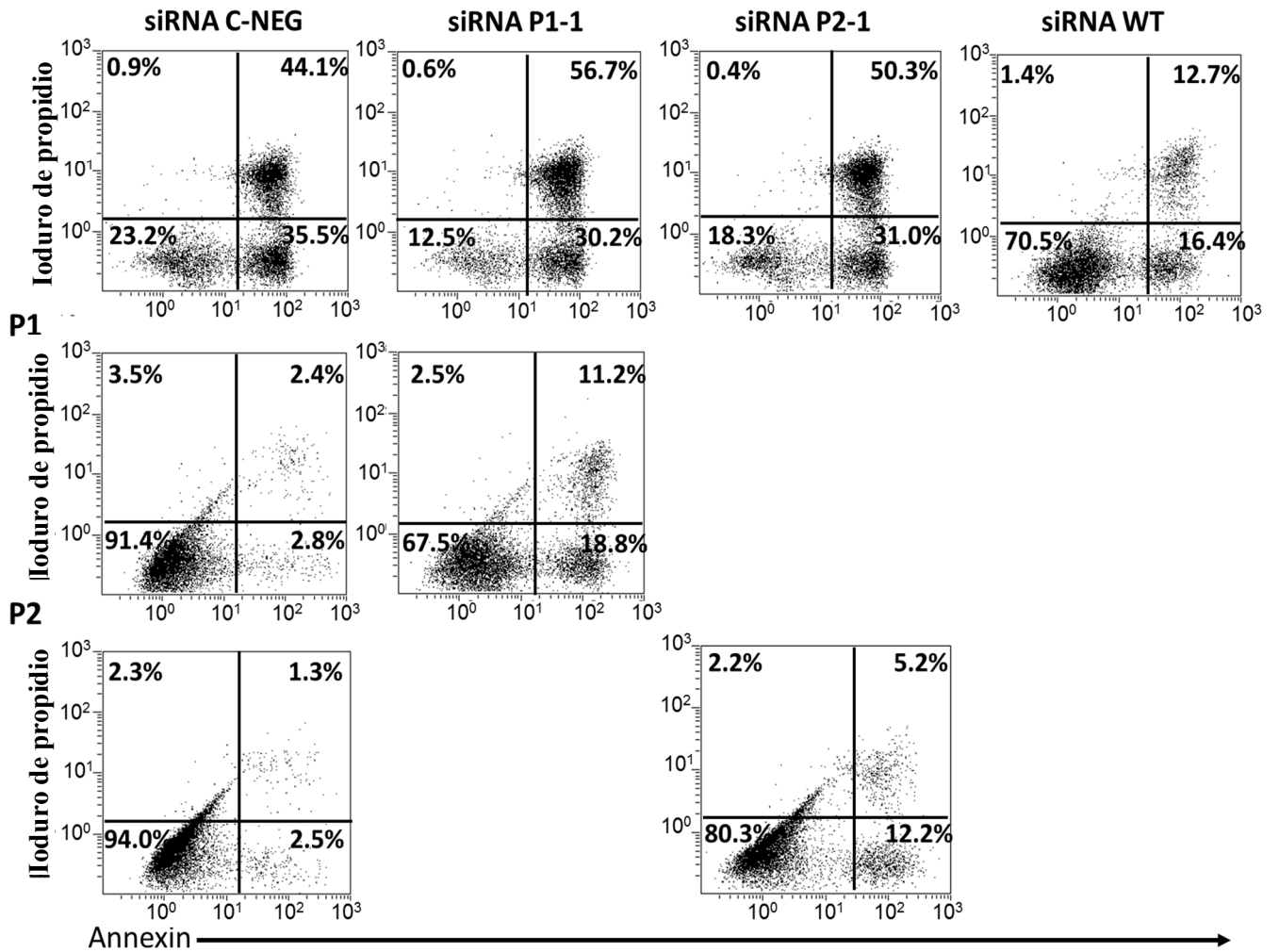


FIG. 2C

D

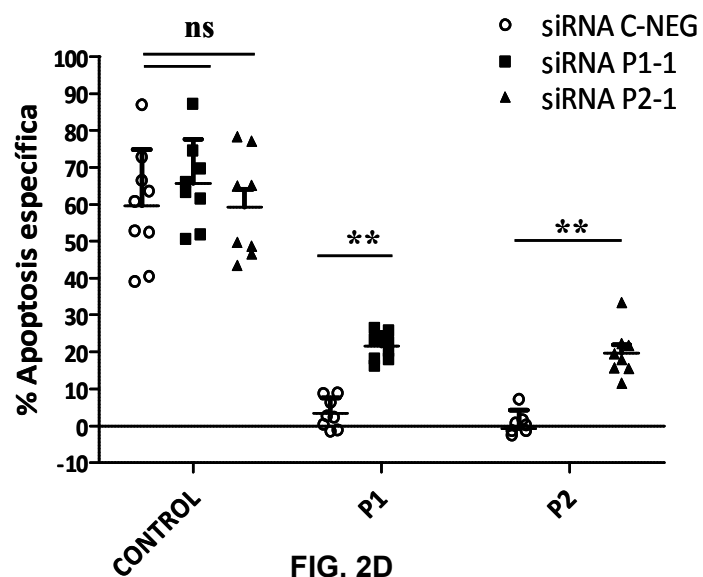


FIG. 2D

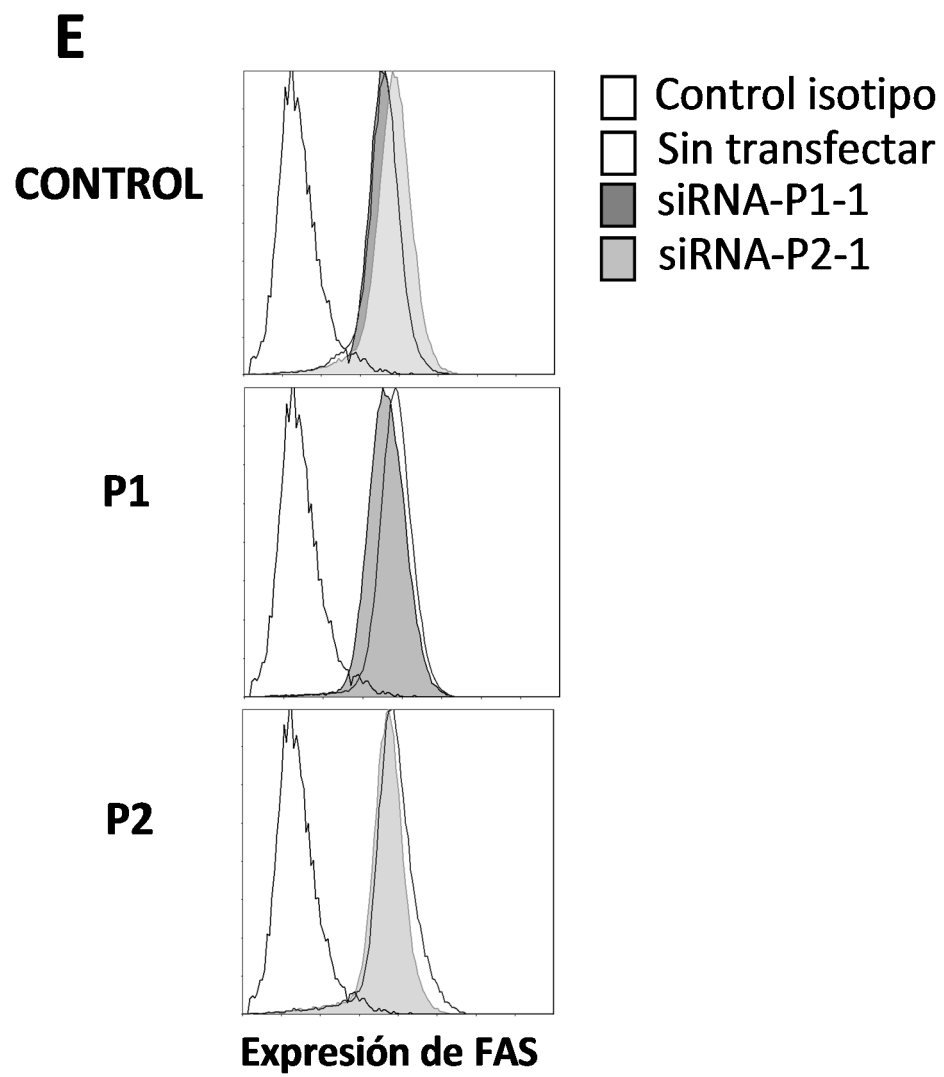


FIG: 2E

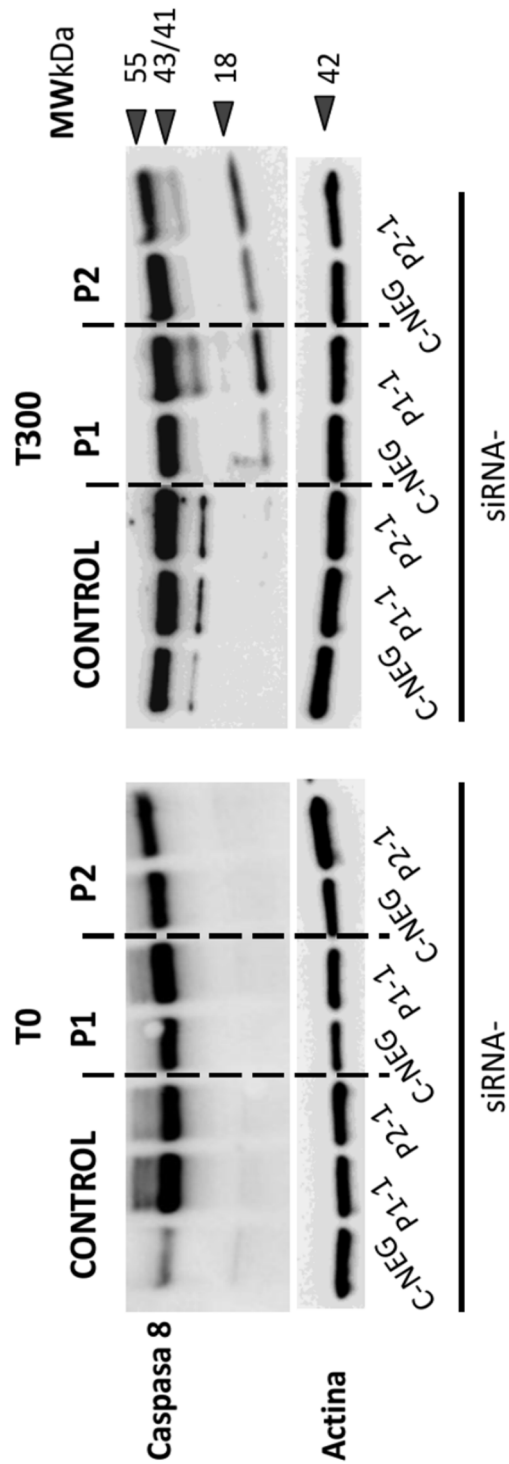


FIG. 3

A

CONTROL

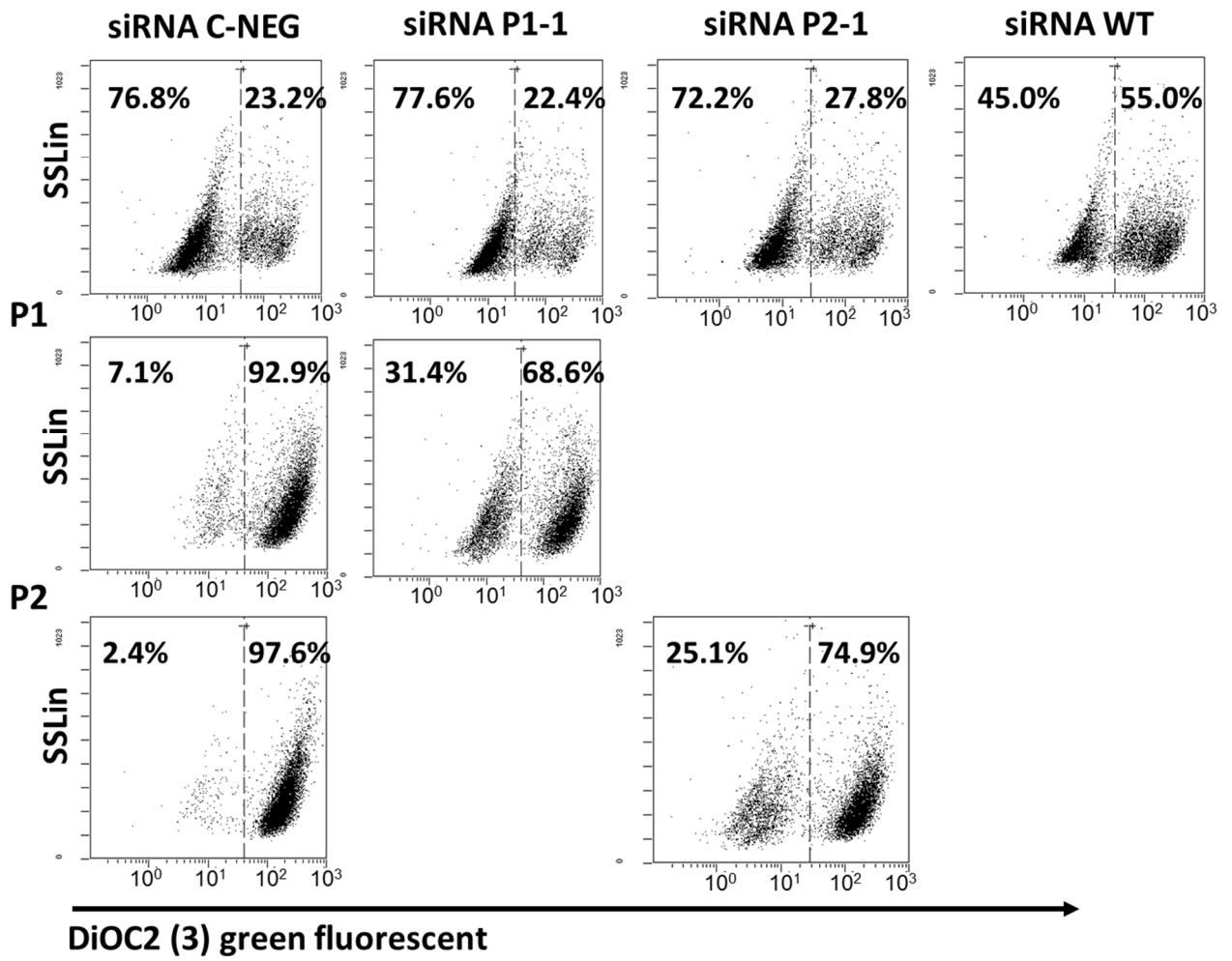


FIG: 4A

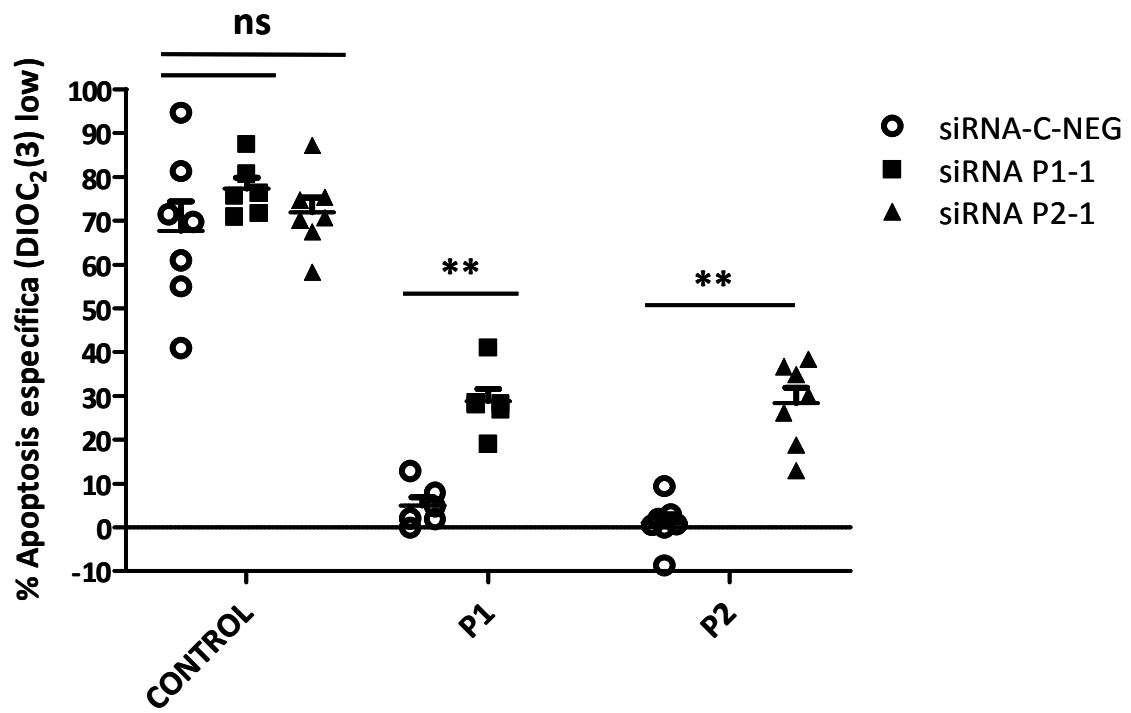
B

FIG. 4B

A

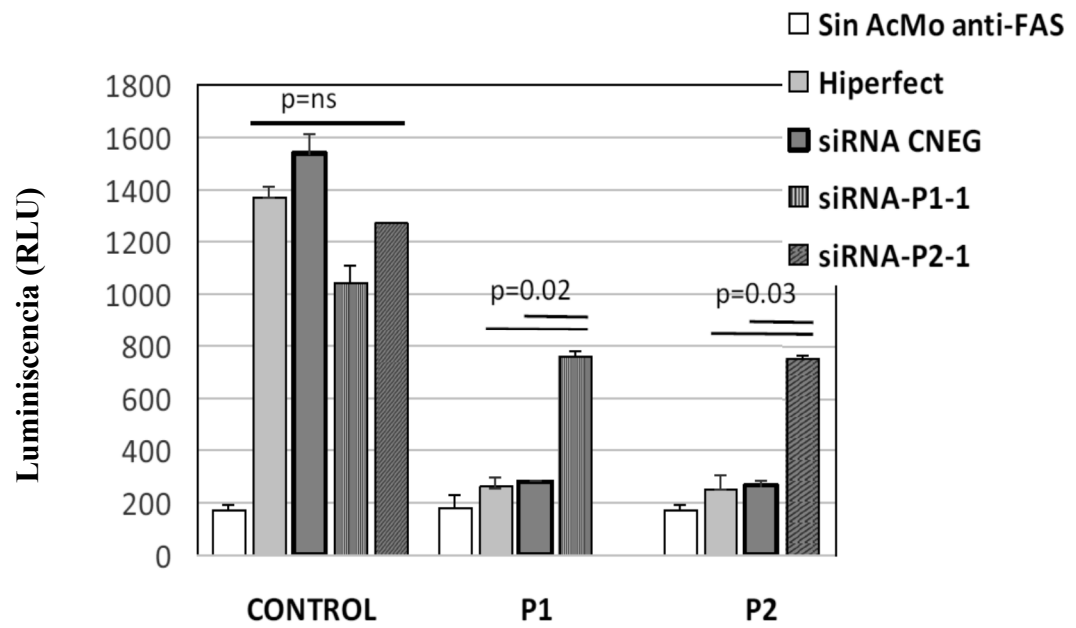


FIG. 5A

B

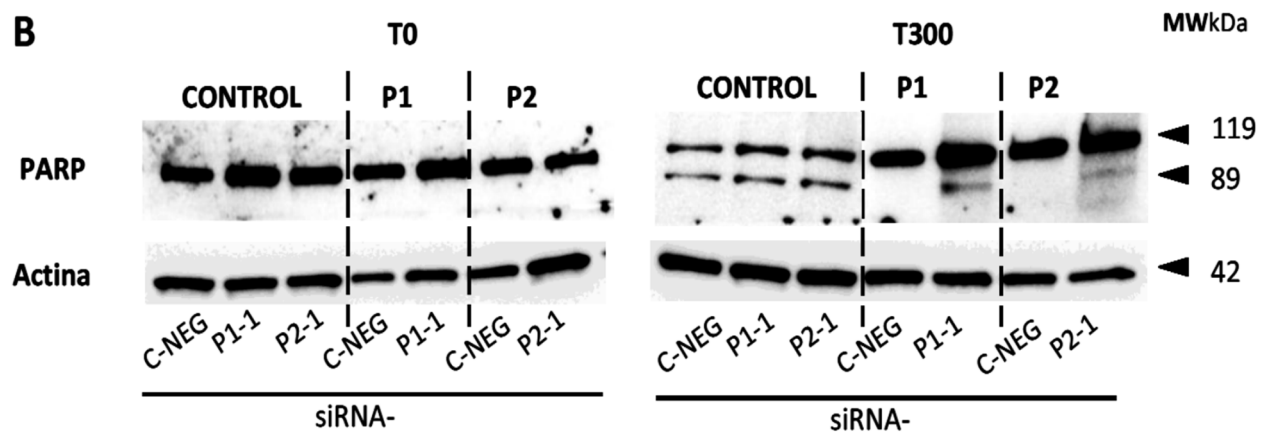


FIG. 5B

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital 12 de Octubre

<120> ARN de interferencia para el tratamiento del Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune de tipo Ia

<130> ES2535.4

<160> 24

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 32255

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> 1..32255

<223> /mol_type="unassigned DNA"
/note="Gen Fas"
/organism="Homo sapiens"

<400> 1

tctctttcta tctctgcagg actccctgta gtcctccctg cccatccatt atctccctca	60
agctgtcccc tcagcctttt ctaacaggga aaggctggtg ccctggtaaa gagtccccc	120
cccccatccc actccctggc actagatggg cttgggagac aatgactgcc cctccctcat	180
gctgttctga tgtctcttgt tccttccagt cacctccctt ccaggcccat gaggagggcc	240
tgaggcccac actagctagt cttttctctg gaggttggtt gggggcaggg aggaagtcta	300
aagtagagag aaagcgctgc catgccttaa gccaaccttt ccagaagtat aatgcccttg	360
ccactagtag tttgggaaac aatttttatt ggcatgcagg caaatatatt gtttcaatag	420
tggcatattt atttttatgg ataccttcta tttttggcaa ggaatgctga ttttccattt	480
atgggtataa tgtaatgttt tattttaaaa acaaatgac ttagggaaca aaataagttg	540
acttaaaaat aaattattag ttaaataat atttagtata tacaagtaga ctacagaaat	600
ggcaaaaatag attgaagttg aagaaacatt gccttaagct aagcccactc aggatgaaat	660
tttatctgcc cccaaatcaa catctcttga aaagtggctc ctatctttcc ttgtgtcagt	720
tcttaacacc cagggggtag gcatgcttct catgtttgtt ttcatagaat atctgtgttt	780
tcaggggacc accatatgca aaaatgtcag gggaggggta ctcaattgga ttaagaagcc	840
agggcccaca gaacagatgt tttcacccta ctaaccat tgctgtctgc tttttagttg	900
ccacagtcta aacattcttt aatgcattgt ctttttcagt cattgctcaa gaggtaggtt	960
agtataccag tttcatagt gggaaaaatt aggagactta ataatttgct gcatatcttg	1020
gtggccaagt tttccagccc tggtcagtta ggcttttagga cacttttctt aggcttcagg	1080
aatgtgagca tggaagtagt acagaaagga agtagtacag aaaggaagta atacaggaag	1140
gaagtagtgc aggaaggaag tagtgcagga aggaagtggc acaggaagga agtggtacag	1200
gaaggaagta gtgcaggaag gaagaagtat aggaaggaag tagtggagga aggaagtagt	1260
acaggaaaag tgggttgaag ccatttaact tacttttttt catctgaact gtgaccccca	1320

ES 2 547 471 A1

aattatcaat	ttgtcttgtg	aagtcacttc	atthagga	agcaatgt	aagtaaaat	1380
tagtatttat	tgtgtgtact	aggtgatttg	catatgtcat	ttctttaatc	ctgtaggaaa	1440
taatatgttc	tccaggaggt	gacaatgtct	atatgattag	attcacagat	tacctatcca	1500
aatctaagat	ctccgtcctc	tctcttcctt	tccaagaac	ccatacatat	ttctattaat	1560
tggtagaaat	aattattaat	agactttgtc	acttgccac	tgtgggctct	gacgcctct	1620
agtgacagaa	aaattccttg	gtagaagaag	taatatccct	agatagcagt	ctacagaatt	1680
gtttaagcaa	ttatctttac	ttgagcttga	aactagaata	gctaatttgt	aacaattaac	1740
ttttgtaaca	aaagaattat	tatactgatc	aaagttctga	taatttatca	gttaagattt	1800
tttcagttgt	agaatctag	cttaagcaga	aactaagaat	ttgtagagtt	gggtaacttt	1860
gggtggtcca	gggttcaatt	tcagaaccaa	atgcatccag	aacttgata	gctctaccaa	1920
ccttgatctt	tcagcatggt	ttcctctcag	tgtggtttcc	tctcagcatg	agttgactgt	1980
tttcagctct	ggcagggcc	caagctccct	tcacaaccaa	ccacatcagt	ttcacatctc	2040
acatatttct	acttcaaadc	caatgaaaaa	gaaagggttt	gtgtcccagt	gtttccagta	2100
aagatcccaa	aatctactcc	aactgaatgt	gatgtgctga	ttggcttaag	ccaagtcaca	2160
tttcccaccc	actacctccc	tccacctaca	catataccca	agccctggga	ttggtaccaa	2220
tgccactgtg	atggttaatt	ttatgtatca	aattagctag	gccatggcac	ttggctattt	2280
agtcaaacac	tatcttagat	gtttctgtaa	agcaatgttt	tggatgggat	taacatttaa	2340
atctttacac	tttgagtaaa	acatttgctt	tctataatgt	caataggcct	tatccagtta	2400
gttgaaggcc	ttaaaaaaga	aaaaaaaaaa	gactgacttc	cactgagtga	gtgagaatta	2460
tgccagcaga	cggccttttg	acttgaacta	taactttttc	atgggtctcc	agcctgtttg	2520
ccaatgctaa	agttttggac	ttgccagcct	ctacaatcac	gtgagccaac	tcctatctat	2580
ctttccattt	attcattctc	ttggttctat	ttctctagag	aaccctgact	aaaagaacca	2640
ctcacatcaa	atagttaaga	agaggggaga	gggacagttt	ttctaaagac	aacttgggaag	2700
tactattacc	agaaggaaga	agaaggagaa	aggcaggata	aacagtcatg	gatatacact	2760
atagctggga	gttattaaaa	tcaacttatt	gcaatttagt	aaaaacaatt	tggttgacaa	2820
cattttttta	acattaggac	caaaggggaa	aagaacaaaa	gtcttagtgg	taaaaagatg	2880
tagaagtttt	tttttttttt	tgttttgttt	tttatcttaa	ctcttcctgt	ttttttacat	2940
agtcaagatt	cttgtttaag	tgttattcag	aatgttcaga	aaccaggata	tcttttgagt	3000
agaagcttta	acttatatgg	tatggtttga	ataaggatgg	ttgtccaaaa	tatctccaac	3060
atctgttgg	gtgcctgaaa	ttctattatt	aaaattttat	ttctttgccc	ttgaaggcct	3120
gaggactctc	aggaatatgc	tggtaaaata	aaaataacct	ttagagatgc	ccaaactggt	3180
ttccccagaa	caccagcatt	cattaggtgt	tcattcaata	gattcttcaa	aggattccaa	3240
aggcaaagaa	gtttggggaa	cagtatatat	aattacccaa	ccctttgaca	ttagcatact	3300
aagggccctg	agaagttttg	gattcagaaa	gttttcaaat	ttaaagtaacc	cagaattttc	3360

ES 2 547 471 A1

taagattatt	tgaccatgaa	acatatgtct	ccccacaaag	cacatattcc	tatctccttg	3420
aacttgagga	taattagacg	tacgtgggca	gagggtaggg	gaagggggta	tggcatagaa	3480
agagcaggac	cttgggagca	agaatatcta	agtttaattc	ctgactctgc	tattttattaa	3540
ctaaccatct	ttgccaatgt	tgcttaagct	tttttggtta	cattttttta	tttgtaaagt	3600
aagtttaata	atcactcatc	tcactgggct	ataatgataa	gtattaagta	aggaagatcc	3660
acatatgtga	gttgctggct	tataattcac	actcaagaga	tactgatttt	gtcaattgtc	3720
ctttcccttt	tttttctctc	ttccctcctt	ccattccttc	ttcccttacc	tctcctttcc	3780
ttccctcaca	ccccttttcc	ttccttcttt	ttacattttt	ttattttaaat	gaacttttca	3840
ttttggaata	gttttaggat	ttcaaaaaat	ttgcagagat	aatacagaga	atgcccatat	3900
accatcctcc	ttatcccact	tctttttgtg	tctattagat	gctcagagtg	tgtgcacaag	3960
gctggcacgc	ccagggtctt	cctcatggca	ctaacagtct	actgaaaggt	ggaacagaga	4020
caagcctatc	aacacctaca	agactggtgg	taagtgcagt	gacagatgca	aaacacaggg	4080
tgatggaaaag	ccctcaggag	ggtaacctaa	cctagatttg	agggcccaaa	caggctccag	4140
aagaaaatgt	caactgagag	gaagcctgaa	ggatgaacag	tgggctaagc	aaagggttat	4200
taatgtgtta	ttaatgggtt	gaatctaatt	gggaagggag	agaggttgca	gagtgaggtg	4260
cagagcttgg	tggacgatgc	caaaggaata	ctgaaacctt	tagtgtgtcc	agtctggaac	4320
tgcatccaaa	ttcagggtta	gtaatgatgt	cattatccaa	acataccttc	tgtaaaattc	4380
atgctaaact	acctaagagc	tatctaccgt	tccaaagcaa	tagtgacttt	gaacagtgtt	4440
caccagagca	cgaaagaatt	acaagatttt	tttttaaaga	aaattggcca	ggaaataatg	4500
agtaacgaag	gacaggaagt	aattgtgaat	gtttaatata	gctggggcta	tgcgatttgg	4560
cttaagtgtg	tagctttgtt	ttcctcttga	gaaataaaaa	ctaagggggc	ctcccttttc	4620
agagccctat	ggcgcaacat	ctgtactttt	tcatatgggt	aactgtccat	tccagaaacg	4680
tctgtgagcc	tctcatgttg	cagccacaac	atggacagcc	cagtcaaattg	ccccgcaagt	4740
ctttctctga	gtgactccag	caattagcca	aggctcctgt	accaggcag	gacctctgcg	4800
ctctgagctc	cattctcctt	caagacctcc	ccaacttccc	aggttgaact	acagcagaag	4860
cctttagaaa	gggcaggagg	ccggctctcg	aggtcctcac	ctgaagtgag	catgccagcc	4920
actgcaggaa	cgccccggga	caggaatgcc	catttgtgca	acgaaccctg	actccttcct	4980
caccctgact	tctccccctc	cctaccgcg	cgcaggccaa	gttgctgaat	caatggagcc	5040
ctccccaacc	cgggcggttc	ccagcgaggc	ttccttccca	tcctcctgac	caccggggct	5100
tttcgtgagc	tcgtctctga	tctcgcgcaa	gagtgcacac	caggtgttca	aagacgcttc	5160
tggggagtga	gggaagcggg	ttacgagtga	cttggctgga	gcctcagggg	cgggcactgg	5220
cacggaacac	accctgaggc	cagccctggc	tgcccaggcg	gagctgcctc	ttctcccgcg	5280
ggttggtgga	cccgcctcagt	acggagtggg	ggaagctctt	tcacttcgga	ggattgctca	5340
acaaccatgc	tgggcatctg	gacctccta	cctctggtga	gccctctcct	gcccgggtgg	5400
aggcttacct	cgtcttagtc	ccggggatag	gcaaagtggg	gcgggcgcgg	gacgcgtgcg	5460

ES 2 547 471 A1

ggattgcggc	ggcagcggcg	cacgcgggca	cctgggagcg	gcgggctgct	gcgggagggc	5520
ttggagactg	gctcccgggg	gctgttagga	ccttcctca	ggcccgggtg	ctcagaacgc	5580
tggaggactt	gcttttcttg	ggccttgatg	cgaagtgctg	accccgctgg	gcaggcgggg	5640
cagctccggc	gctcctcgga	gaccactgcg	ctccacgttg	aggtgggctg	ggggtgcgga	5700
caggaattga	agcggaagtc	tgggaagctt	tagggctgct	ggagggggac	cccggttgga	5760
gagaggagcg	gaactcctgg	acaagccctg	acaagccaag	ccaaagggtcc	gctccggcgc	5820
gggtgggtga	gtgcgcgccg	ccccgcgggg	gcggggagag	agcctgcagc	cttcagaaca	5880
gatattgctc	atcttctggc	agttctcaga	cgtaggaaat	aagtcagcac	cgaagcagtg	5940
gttaagccgg	agggtcggga	agaacggcac	cttttctttc	tcgaaaaagt	tatatggggg	6000
ctgaatgagc	ttctggaggc	ttgtttaccg	ttttttattg	tcacacagaa	aaagaaactg	6060
ccttgtctcc	cttccgggaa	ttctctcttt	aagactgtaa	gtcgctgcct	gagtggtttc	6120
atcttgtttt	gttttctg	ccttctcttt	cttcttttgc	cctttcttag	cttgcactcc	6180
catggtgatt	tctgcttggg	ctcctgctgg	ggttgggtgg	actcgttccc	accgcacaga	6240
acccggcgcc	tattattggc	caagaaactt	gagcagcctg	ttttgaaaag	tcctctgctc	6300
agaaatgcca	gcttgcat	ggctaataca	agagacgtgg	atccaggagg	ctcatttgag	6360
taccggagcc	tctgagagtc	catggatttt	tattttattg	ggccccaaca	aagtgccagg	6420
catagcgaga	gaagtgttta	caaagtgtat	ctccgcggat	tctcacgaga	gccatgtagt	6480
ggggaagata	accacatccc	cattttacag	atggcgaaat	gaggttcaga	gagcttcagt	6540
aattcagcca	agatcacaca	gctagtaa	gggagatatg	ggattgaact	cagatcta	6600
tccaaaactc	aggctgttcg	ctgattgcat	ctgatatcca	gattacacca	agaggctgag	6660
atgtctgggt	ccattttatg	attagaaaaa	aaaatcctgt	tcctttcaga	aatagtgtgc	6720
actatttggg	attctttaga	aacttccttg	gagaaaatta	atgattcaag	attgagaaaa	6780
catttataca	acctcaggcc	acactcttct	ctctcttgtt	attaaccatt	gcaccactgc	6840
aatgttggct	gctttgaaaa	tctcatagtt	tttgacagc	agtattagta	aagtgtgaaga	6900
aaattgtcaa	agcttggagc	tatgcttgtt	gaacttttgt	accaatagca	cctttaccag	6960
aggctgcgtg	tttaaagccc	gaagaaaact	ttgcttttct	gaaagaatac	acacacacac	7020
gcatatgtaa	atattcatac	atctatgtat	atatacatat	tataatacct	ataagttagg	7080
tataacttat	atttgtatat	gatatatggc	ctaggaaatt	aaggcttatt	aaataaaatt	7140
tataaatgca	gatgagtc	atacaagat	cagacataac	tctatcacct	aagtaatcat	7200
tgtttacgtt	ttgcagttta	tcttccattt	ctcccctcta	atatgactct	tttaaattta	7260
gttacacaga	aattggtttt	gcgctcacga	catgcctaac	atcaggcctt	tatccttaaa	7320
gaagtttcaa	cactcttgtg	tcacctcatg	tgtctacaga	aaatgtttgc	ttttatgcct	7380
tcacggttat	gttttcttag	tagtagcaat	aaataaaata	gatgcaaagt	gctaattact	7440
tggaaatacag	aagcaaattt	taattctatt	aatgggctgg	acatagatgg	gtggggagct	7500

ES 2 547 471 A1

gttttctgct	tttcccctct	tcccctagtc	ctctgactct	ggtgataact	atagtcaaca	7560
agtatcccca	tccttaaccc	cttttgcttc	tctttctctt	tccttctctc	aaccttcctg	7620
gtgttagttt	tctcttttct	atttctgagt	gtttttactc	cgacacttac	aataaaaaag	7680
tttgaaatcc	caaaaagttg	acaaatttct	aaaggagaca	gaaaaagagt	caaacttact	7740
ttacaaatta	atttgagaaa	tagctgtggg	ttgcattttt	tttttttatt	gtgcatgacc	7800
ctgttattgg	ccaagaaact	tgagcagcct	gttttggaag	gtccctcgct	cagaaatgcc	7860
agcttgctaa	ttgaagggat	gtggatccat	gaggctcatt	tgaattccga	agcctctaag	7920
agtccatgga	tttttatttt	attgggcccc	aacaggtttt	gtcttgcat	atttaggaca	7980
ttggccaggc	aatcactgga	cagccagttt	gctctccttt	acattttgta	gaatggttat	8040
cttatgggtca	aaggaaaggg	agagggcctt	tggaaaataa	agctgtgtat	ttacaagcag	8100
tcatacagaa	tagttttgtg	gggaaaataa	agaacagtta	tttaatttgt	aatttaataca	8160
tttttcttaa	accaacccaa	agagcataaa	atggaatatt	tattttattt	tgtagcttaa	8220
tttgtaattt	aataattttt	cttaagccaa	cctaacgaac	atattgggct	gtttattttc	8280
atttttaatg	ggccatattt	acatcacaaa	ggacttgaga	agtcttaca	atacaataaa	8340
atgataaaat	atgaattaag	acattagcaa	ccaggatgga	aaaacacaaa	tttgtaaagt	8400
atggccagggt	ttgcaagcaa	aaattaaatt	gataaatggc	agcaccacca	ctaccagcta	8460
tagttagact	gatgaaaaat	cctctaattgt	tcatgcctga	aatacagtta	ccacccttag	8520
cagcaaatta	gaggcaaaga	agttctggaa	tttggacgtt	gtctctgagt	aagctctttg	8580
agacactgga	caagtaattt	ccttctgaat	actcttatac	tgacacatag	gagaagtgtc	8640
agtgtttcaa	aggaatctct	ttgaaggcta	ctacattgct	ttaggggtgc	cagattacca	8700
gagtaaactg	ccagtttgag	agaataactg	tttcttaaga	gatgggtctga	aacctaagta	8760
aggaaatccc	cccacttgaa	agcccctagg	aagttaattg	cttttggaag	attatcttgg	8820
gccccaaaag	tcccttgatg	agcacatgtt	ttgtaatagg	tactaaagac	tattttactta	8880
tgatgaaaaa	taaaataaca	caatttaaaa	cttgaaattg	ataaaaagca	acttgaaacc	8940
aaatttagga	cagtgaaccc	atccccttct	tatttttaaa	taggtaaata	tagaaaaaat	9000
gaccacatga	tgtgaaacaa	aaagcaaata	tttaaaaact	acatttatac	tttatctcac	9060
cacactaatg	taaagaattt	tgattttact	tataaattct	tagccttgct	tacacatata	9120
cataattgca	tgtttaattt	gagctatata	tagtctgttt	tttgttcctt	tgcatgttac	9180
acaaaccttt	ttctatttct	acataatttt	tatctcatat	tttttattgg	atacattata	9240
gagagagcat	ttattaaatg	agctgggatt	actataattt	ttattattta	ttttttaatt	9300
tattacttat	ttttataatt	tactattgaa	aaaaagcatt	tcttaaattgt	actgggatac	9360
atatatatat	atgacttttt	cttggttacta	aaaaattact	catagaactt	acatatataa	9420
attttaggac	ttgtgatgaa	aaataataaa	ataattcaaa	acgataaaaa	gcaacataat	9480
tttatatgtt	gtaccttgta	cttccttata	aggtacaaca	ctacaatagc	cttagtgtgt	9540
agttttcttt	ttgctatgta	tgtatatata	tattcataaa	agtggaaaaa	taacatttaa	9600

ES 2 547 471 A1

taaatcctct	ttatitttctg	gaaaatcctt	gcttttaaaaa	aagtcttttag	ctttttatat	9660
agttctactt	ctaacaccaa	ttaaatatct	tcaattcagt	ctcaagcagg	aacaaatcct	9720
cagtccactt	gcctaccttt	actgtctttg	aagtgacagt	gtgagtagta	aagcccaa	9780
cagagagaaa	ttgacttttg	taagattggt	aacttcacct	tccccggaag	gaaatgaggt	9840
ggttcttccc	tttgatcaca	actgctttct	tgatttgaaa	taaactggtg	tacagcccag	9900
tcaccccatc	tttagacatt	tagaaatggc	aatcatagtt	atataggaca	actagcctga	9960
gtcccactaa	gtagaaatga	tagtgaat	agtataagat	tataccttta	ggctgggcag	10020
gtgactcaca	cctgtcaccc	agcacttcag	gaggccaagg	tgggtggatc	atggatcact	10080
tgagattagg	agtttgagac	cagcctggcc	aacatggcaa	aaacccaact	ctactgaaaa	10140
tacacaaatt	agctgggtgt	ggtggcgtgc	ctgttatctc	agctactcgg	gaggtcgcgg	10200
caggagaatc	actggaacct	gggaggtgga	agttgcagt	agccaagatc	atgccactgc	10260
actccaggct	gggcgacaga	gtgagactcc	gtctacaaag	aaaacaaaga	aacaaaaaat	10320
cataccttta	gagcaaggcc	agccttgtga	attagcaa	ctgactacaa	attcaatcag	10380
cagatgtact	cagcccagca	aagtgcagca	gcttactata	ggttgtgtta	aggcatggac	10440
tgggataaac	tggcaaaatt	agagtaaatt	tgacaatttg	acattggatt	cattaatgat	10500
agcctgtcct	tcaatgaagt	caggcagcat	tgtgttttcta	ttcacctctg	tgttttgtga	10560
ggctataaaa	atataagata	tgagaaatgt	gaatactttt	tatttgtgag	ggcagatata	10620
ttgaaaaaga	gagcgagagg	aagtcagagt	atgcgggtga	agactcttgt	ttttttgctg	10680
aggatttagc	tttggttttt	agccattctc	acagagatca	ttggtcctaa	ttacttggtt	10740
gttgttgttt	tttttcatgt	gaatgtctgt	aaggtttcag	gcttgatttt	aaaaattggg	10800
cctataactca	cagaaagaca	aatactgcat	gatctcgttt	atatgtggaa	tctaaaagtt	10860
ttgaatccat	aaaagtagag	agtagaatag	tggttaccag	aggctagttg	ggggcaaagt	10920
tgggggattt	aggagatat	tgggtcaaagg	atacaaaatt	tcagttagga	ggaataagtt	10980
caagagatct	agtgtacaac	ttgatgtcta	tagctaataa	caatgtattg	tataacttgaa	11040
aattactaag	agtagatttt	aagtgttctc	gccacacaca	cacaaaagaa	aatgataagt	11100
atgtgaagga	atgcccaatg	taattagctc	gatttagcta	attatcttcc	aaaatatgta	11160
cataattatc	ttccaaaata	tgtacataat	tcaagacatc	atgttatata	ccataaatat	11220
atataatttt	tttatttgtc	gaataaaaa	aatacaaaaa	aaccctgggc	ctatactgcc	11280
cacaggtagt	ggccacaggc	agagctggtc	ccaagccctt	ccctctctct	gtagtccctt	11340
atcccagggt	gctttattct	tgtatgacct	acgtggcccc	tctgggcttg	taagggtctt	11400
ggggctgtat	tttaggactc	tatagccctt	acattaccca	tttctctac	caaaggatcat	11460
ttctcttatc	ttcaagctta	tttttggaag	ggtcattatt	tcttcatgag	aagtcaaatt	11520
ctgatttgca	agtgtgaac	acagatgcca	ttagtctata	aaactcttat	attctcacat	11580
gtaaagttag	taacctgcta	acctcagatt	ctgcttcctc	taacctagtt	gccctgcaac	11640

ES 2 547 471 A1

tgtgatgaac	ctcaaaatca	ccaagggtac	ttccccattc	tcagagatcc	tgattcctta	11700
ggctctatgta	ggggccttag	cactttttat	taaataatgc	atcactacag	gattctgatg	11760
tctgtcgggg	tcttgagaac	tatttttctg	actctagcac	taaactcaaa	atgtaatttc	11820
agatggaatt	tcctaggctc	attcatttta	ttttatttat	ggcttggcca	gtcatggatc	11880
taatcagtaa	cttgcaactg	ttgcttcaac	tacctctgtc	ctggactttc	cagagattgg	11940
ctttaagaaa	gaaagaggac	atccctggga	taagattacc	atgtgtattt	ttatgtacag	12000
attttgaaaa	acatacaaat	gaatgggatc	tttgcttatc	tcttccatgt	agaaaaattt	12060
attttacttc	tatttcaggt	tttcaataat	gtagtaggac	aagatgacat	cactatatcc	12120
ctgtttttta	cacagatata	ttagagatgc	attatcttat	tggaaatttt	aaactattca	12180
ataataaact	attagtcttt	tagaatttct	ttttcctcaa	gtgttgataa	gtaactgaaa	12240
gtctacaagc	agacaagcag	aattagtcgg	tggaacttca	tttcttgctc	catttttgctc	12300
ctcagcagta	gaggggtggtg	agatttcaac	ccagcctagc	aggaccaata	agtctggaaa	12360
gaagtagctc	tagttcatat	tggcacctgc	taattctagt	tctgaagacc	atgggaaatc	12420
tcttgcttat	ttagctcagt	gatcatccaa	gatgggaaat	tcttgggctc	agctgtgagg	12480
gatcccaagt	ttatatgtaa	cactaatgtc	tcacaaatca	agaatccaag	agaatcaaga	12540
gactatagtt	cattccttat	attaaattct	taggactgcc	aactgggtgg	ctacagtttt	12600
gggggctaga	agtctgatat	caagggtgcca	actggactgg	ttccttctga	ggaccacgag	12660
ggcaggatct	gttcaggctt	gtagatggcc	ttctttttcca	tgtgtcttca	cattatcttc	12720
ctctgtttgt	atgtgtgtcc	aaatttcctc	ttcttttttt	ttaatttaga	aattttatact	12780
gtctacaagc	tttatatagc	tttagttaa	aaaaagcaaa	aaaaaaaaaa	aatcaaaaca	12840
aaaacagtga	agccaagaca	ctcttccaaa	gtctggaccc	ttccggcctt	caaatacaaa	12900
gagctctgga	agttgtatat	accaaatttc	ctcttcttaa	aatgtcacca	gtcacattgg	12960
attaaggctt	accctattaa	caccatttta	acttaatcac	ctctgtaaag	accctatctc	13020
ctgatacagt	cacattcgga	tgctcaggaa	gttaggggat	cagtatcact	atatgaattt	13080
gggagttggg	ggaggacaca	gtttagccca	tgacagtcct	gaatctcctt	tgctagatgc	13140
atgactgtgg	gccagtcact	tcaccagttg	ggatactgcc	atctctatca	gaaaaggggt	13200
ttgggctagg	tcatctataa	agtcctttct	gctctaaatt	gtaaatataa	tgagatacca	13260
acatttagtt	taattgttta	aaattttaga	agctaactgg	atgctttgct	ggtgtcaaca	13320
ctccccttta	caaaaaaaaa	ttcggccggg	catggtggct	cacgcctgta	atcccaacac	13380
tttgggaggc	cgaggcaggc	ggatcacggg	gtcagagat	tgagaccatc	tgccaacat	13440
ggtgaaaccc	cgtctctact	aaaaacacaa	aaattagctg	ggcctgggtg	tgacatctg	13500
tagtcccagc	tactcgggaa	gctgaggcag	gagagtcact	tgaaccggg	aggcggagct	13560
tgacgtgagc	cgagatcgcg	ccactgcacc	tccagcctgg	caacagagcg	agactccgtc	13620
tcaaaaaaat	aaataaataa	ataaaataaa	ataaaataaa	ataaaatctc	actttctgtt	13680
tctactgttc	tctcaagtac	ccctctgcct	tctgttactt	ctttgctgca	ttctgagagg	13740

ES 2 547 471 A1

aatggggtgg	ggagcactct	ttcctgtaga	accccataac	ccatctat	ttt	tcatacaattt	13800
atttgaaatt	caaagccagg	ggttaaaatg	tccactttca	atttgagatg	tctaactttc		13860
agataaatct	attaacatgc	atttctaagt	gactttttaag	ctaagcattt	tattttattg		13920
agctcgtatg	gaagggtaac	tattatactt	gtataataaa	gtgcactttc	aaaaatactc		13980
ggttcaaattg	taaaataata	ttcgtaatat	tttaagacaa	acctcctaga	acttatatgt		14040
gtctttcttc	ccagagcagt	ctctatgggt	gcctaaacaa	tactgcatta	ttagattttt		14100
ttcagtttat	aagccacaca	agaaagttaa	cccatgtcat	ctctagaggc	ataaaaaatag		14160
acagttgttc	tgagaaacat	atctgtttat	tcctagttca	gtaacagcgc	aatgagatcc		14220
taaattatga	ggtacttttt	gtttatctta	ttgtctcatt	ggcaaccagc	aactcctggt		14280
gcatttttga	catgggaatc	tatcaggggtg	tggttaataa	agtacatttc	catggtaagt		14340
attctttaag	aaaaaataaa	ccaagatttc	atcagagaca	gaaattactg	caaactgtac		14400
ttaccagttt	ctgggtgattt	gtataactga	gctttcaatt	tcaaaaatta	aaaagttctc		14460
tttagtgtaa	catatttttg	tgtccagtaa	ttttacttca	aaaataaaaag	agaattttct		14520
ttaccatcaa	acaacgttgc	tgtaatgagt	ggtgatata	ttagtcctag	aggaccaaag		14580
agaaataaaa	tggctttgat	tatgctgggt	taagaaaata	tatccgatga	aacagagggt		14640
aatatttgtg	atgtttgatt	tagtaaaatt	ataagactac	caaagaaaac	tagaagagca		14700
aaataaccaa	aatttatata	aagaattcaa	tggtgataat	tcaaagggtt	agaatttttt		14760
ccacctttca	aatactaagt	tgctgttata	gatttactac	cattattacc	cagattttct		14820
attttactaa	aaaataataa	cacagttcgt	tatgataaat	cagtatagat	ctttaggctc		14880
aacacaaccc	tgctaccttt	taaacttttt	tattatacaa	caaacacata	tgcattatca		14940
agaaaagatg	agtttagcaa	aatgaagaaa	aatagtctta	tcaactagaa	ataagcacca		15000
ttaaaatttc	tgtgtgttaa	aagataatat	gctgctgaaa	cttttttttt	cttgaaatgt		15060
ccctcttttc	tttcactttt	cattttctta	atccctaacc	ttctactgtt	gaattttctg		15120
gaccaccgtt	ataccccctc	atcaataggg	catttttttc	tgcagtagct	gagcacaatg		15180
gtcatattga	agaaattccc	ttgtgggggc	tttgcctaga	ggtaaaatcc	tcttgccggg		15240
gtgcgttggc	tcatgcctgt	aatcccagca	ctttgggaag	ctgaggcggg	agcatcttct		15300
gaggtcagga	gtttgagatt	agcctggcca	acgtggtgaa	atgccgtctc	tactaaaaat		15360
acaaaaaatt	agccgtcata	gtgtgcattc	ctgtaatccc	acctactcgg	gaggctgagg		15420
caggagaatt	gcttgaatgc	cggaggcaga	ggttgtagtg	agccaagatc	tagattgtgc		15480
cactgtgctc	cagcctgggt	gacagagcaa	gactccgtct	aaaacaaaac	aaaacaaaac		15540
aacaacaaca	aaaacaaagt	aaaaccctct	tactgtgat	gactctaaag	cttgcttttg		15600
tctctctaaa	tcacaacaaa	ccgtttgcag	tgtgatgctg	tgctcaaaat	tgagaattct		15660
cactgactgt	tccaggcatc	tgtctactca	ttcttgccat	gctgagggct	gtcattttctc		15720
accactgaat	gccttttttt	ttttttttgt	gcttcttttt	aaaagtcttt	tcctgtttgc		15780

ES 2 547 471 A1

tttgaacttc	aataaaaaca	gggggtaaga	aggtaatatg	cttttatttt	gtctgtgggg	15840
tttttttctt	ccttcttttg	gttccttttc	agatcctagc	tcatcaaggc	catttgccac	15900
actgacactg	gaataagcct	gaatgggggt	ctatatcttct	tccagtagtt	agtttaattc	15960
ggtcattgag	ctgttgctct	atttgtaacc	gtcatgctag	atccgagggc	tgactattcc	16020
tgagaaagtg	tggagatcct	ttcagactgc	catggtgcta	gggcagagtt	tcagtcatta	16080
tcttctgtgt	ctgctaattc	ttgcatcatt	tcttctactc	tgtaacctgg	ttggctatga	16140
aaagtgattc	ttcctcactg	atgctgcagg	caatgggtga	atatccaatt	gttctctcag	16200
gttcttgtca	tcggatacaa	agaacaaatt	tcatgtgtcc	ctgtttctga	gaggttcaaa	16260
gggagcaa	gcacagattc	tagcttagga	tgacttccag	cttctaacta	tttgtctgtg	16320
cattccattt	cctcaccctt	gcgagagggt	gcagtcattg	taacggctgt	tctgagaaat	16380
tcagtgccca	aactggaggg	aggggaacac	aaactcagct	tcttcccaag	cttcagggca	16440
gggctggcaa	gttttgctt	ccccgccagc	aagagccctg	gcttttagggg	tcttgctaca	16500
gttttcccag	actggaggtc	ttggggctgg	attctgggtc	ttagcgaatt	cttgccaaac	16560
acctcccctt	tcccagtat	ccatttggtt	tgaaggttct	ttgcaggctt	cttgccaata	16620
attgtcttaa	aacaaatgga	gttgtttgca	tacctagatg	gagtaaaata	tttaggaaac	16680
tattctacaa	atatgaaaca	gccagattt	gggccagaag	tcctggctct	gagtctcttg	16740
ttagccactc	ttaactgtga	attattggac	aaatcatttc	tcgcactctg	tgtaatctgt	16800
cacctgggta	cttgatgatt	taaaccagga	attgtggccc	ttctcataat	actgtctcct	16860
aaatattggg	tgaatttagt	atatcaagga	gggcagggca	ctatacccg	aggggactct	16920
ctctctccct	ctgtctcttt	gcctttctca	gatatgcac	tttggtggca	gacctgggg	16980
tcaaaccaca	gttgttttga	aatttctctt	tccttctcca	ctatgctccc	cctcactgaa	17040
actttaataa	taaaagtagc	acacttattg	ggcatgtatt	tgttatgtgc	caggttctgt	17100
gctaacagct	ttaagtgc	tattccacgt	attttcacia	caagcctgtg	aggaagaggt	17160
tatttccact	tatagataaa	gaaactgaga	cttgagaga	gtaagtgatt	ttaccacaaa	17220
acacagggca	gtaagtggga	ggccctgttc	accttagaac	acctggcttc	tatcattcat	17280
ggtgctgttt	ctagtgtggt	ttgaagaacc	tgagatccaa	actgctatac	aagtgacctg	17340
ctgctttctt	ggagagagaa	atctgaaaga	cagtggagcc	ctcacattgt	ctttgcctgt	17400
gcacagcaga	tactgccaat	tttgggtggg	ttacacttgt	ttaccacgtt	gcttacttca	17460
gaaatcaata	aaattctctt	catgctttta	ttttacaggt	tcttacgtct	gttgctagat	17520
tatcgtccaa	aagtgtta	gcccaagtga	ctgacatcaa	ctccaaggga	ttggaattga	17580
ggaagactgt	tactacagtt	gagactcaga	acttggaagg	cctgcatcat	gatggccaat	17640
tctgccataa	gccctgtcct	ccagggtatgt	tacacaaaac	atccagagat	tacagtgaaa	17700
gtcacagtta	ggagtagcac	atagtaatca	tgactataat	aattttacag	tttttggttc	17760
ccctatatta	tataacataa	ctgagagaaa	aacaactatg	aaattatttt	ccaaagatga	17820
gttttattta	tatttatcac	gcttatttga	tgtgggttatg	gataaattta	atttacaagt	17880

ES 2 547 471 A1

gacatgcacc	tctgaaatga	gaagactggt	ctatttggct	ccattttttt	ctaagcaaaa	17940
atgactcatt	tgtgaatatg	aaagcttatc	atgtcaaaac	tgattaggat	ctaccataac	18000
aatagtggaa	ctctgaaagc	aagagacttc	tcctcttaag	ggatatgtct	cagcacttcc	18060
cttcaatcag	aaggtctcta	agaaagctgt	cctggcactg	aagcctgcaa	aatatatattg	18120
cattttgcag	ctgaataact	agacgaataa	gaaaagcaac	aggcagaaac	caacagcttt	18180
tttttttaaa	tcaatacttt	gaagggcaaa	ctaatttcag	atcacaaatc	cttcaaacac	18240
tggtaaatta	gaagctaagc	aaaatgcaat	tgtgcaaaca	tttcttcaac	tttgagtaga	18300
gttgaaaaaa	ggaaaatagc	acatgggttc	atgtgataga	ttaatagaac	aaaaaaggac	18360
tgtagtatgt	ttcatgggtg	tcctcccagg	cttccagcac	tcaagctgta	aaacaggatg	18420
ggtcctgttt	gtgaaaagat	tctaccagtc	tcctgtgtct	tcatgtccag	attttaataa	18480
ccgttatgga	aaaatctccc	ctataacca	acccatttat	acttaaacc	atttacactt	18540
aaatcttctc	caacacgaat	aaagaatggc	gtcctggctt	tattataacc	tgctaaacac	18600
aatcaatttg	ctctatgaat	tgaaatcttt	gttcataatt	ttaaaacct	aaatgtaaat	18660
taaaatgaac	aaaatatgct	ttgcacatca	aactgtcaag	gatttttgtc	tattgctttt	18720
tcggttttgc	tttgttttat	tttaatttaa	gaagtgaatg	taaattgtta	caaactttta	18780
agaaatacat	ttggatatat	gagtcaaaaa	tttgaaaaaa	aatttttttt	aacttttttt	18840
tcttattatt	atactttaag	ttttagggta	cacatgcaca	atctgcaggt	tagttacata	18900
tgtatacatg	tgccatgctg	gtgactgca	cccactaact	cgtcatctag	cattaggtat	18960
atctcccaat	gctatccctc	ccccctccc	ccaaccact	gtttatactt	gctaagatag	19020
caattaattt	atacgaaaat	accctgagaa	aataatcaaa	aataaaggaa	aatattgtac	19080
acatgatatt	tcattatcaa	tatgatgtag	gattccttag	gtaaattctg	gaatatttaa	19140
agactgaaat	agtatgtatc	aaagtcatgt	tttctgatat	atttctaata	taatcctcaa	19200
ttatataaac	cttcttaagt	aatttccaac	tgatctggct	ggattaactg	attctccctg	19260
atccgtctat	aaaatatcct	ggatggcatc	caaccatggt	aaatactctt	cccacttcaa	19320
ttccctcttg	ttgaatttta	ggcttatcaa	tatctaagtt	gcttccaaat	ctgtttatgc	19380
tcattagtgt	tgtgatattc	atatgtaatt	tgattgaata	ttgcataaat	taatgaaata	19440
caaatacaga	gaaaagacag	attttatttc	taagaaaact	aggttgagtg	ctttggagaa	19500
ttcaataaag	atgagctgct	aaaatgttgt	tgatgaattt	tgtgagggaa	aaataaaagt	19560
taagtagtag	gaaaaatcac	aaaaatctct	aaagccattc	atagagatta	ttggtatggt	19620
tatgttttcc	tttcatcaaa	aacgaaggga	gggagggagg	gagggagggg	ggagaaaaaa	19680
agaaagaaat	gaaaaaggaa	gagaaaaata	gacaaacagg	aaattatagg	tgatgcatta	19740
tggtatgtac	ttaagaaaga	acctgggatt	ataataactt	ctatatcaca	aaattgtcaa	19800
atgattatat	agttatat	tataaattaa	aacaaaatat	ttacagtatt	tttaagtgat	19860
ttcctatgta	aattgacatt	tttgattaaa	tgatcaaaga	agtcctcccc	acatcatcat	19920

ES 2 547 471 A1

attcaataag	aaggattcta	tggtatactg	cacacatatt	tcatatatac	acattgtaca	19980
tatatatata	tacacacctg	ttatatatat	gctcatgcat	atacatgtat	gtatgtatta	20040
tatgcatagg	aatgcaacaa	aataacggca	atatctccag	attgttgata	tatagttttt	20100
tgtttgtttg	tttgtctgtt	tttttgagat	ggagtctcac	tctgtagtcc	aggctgaagt	20160
gcagtggcat	gatctcagct	cactgcaacc	tctgccttct	gggttcaagc	aattctgcag	20220
cctcagcctc	ccaagtagct	gggactacag	gagcacacca	caacaccggg	ataatttttt	20280
gtgtttttaa	tagaggcggg	gtttcaccat	gttggtcagt	ctgggtctcaa	actcctgacc	20340
tcagggtgatc	tgcttgcctt	ggcctcccaa	tctgctggga	ttacagacat	gacccactgt	20400
gcccggcctg	atacataagt	tcttattata	ctttcctgcc	ttttccaaca	tttctataat	20460
aagcatatgt	accattatac	taaaaaaagt	attttaaaat	ctgattttca	ataaaaacaac	20520
tacttatttt	cttattttta	taaattttgt	tttcatactt	tggaggaacg	aaagaacctg	20580
tggtttactg	tatctccatt	ataccaagga	agttgtgcta	ggcacattct	gtaagataat	20640
tcattaaaga	gaccaattca	ttcagagacc	agtataatac	cactagcaaa	aaataaaaatt	20700
atacttggac	ttgggttctg	ttttctttta	atattgctac	aatgttatat	agccctatgc	20760
actatttttg	aattttgttc	tgggaatctc	cagtttgttt	tttactattg	acagactatt	20820
atctttactt	actaaaatag	catatatatt	tacatgtcat	aatttgctca	tgtagtaaatt	20880
attttgtttt	atcaaaaaga	atatatgaag	ttattaagga	attcatgttc	ctaggaaaca	20940
cagcagaaat	taattttgct	gtataggtga	gcagagcaga	ttaaactgct	tatattttta	21000
aaactagtta	taccattaac	aattagagtc	actagtaatg	tttttctcac	acttcccttg	21060
atattttctg	tcactttctt	cttaattctc	tattccctta	ccttcatcta	gctttcccca	21120
tagcattttt	ttagcacttg	atatcaatat	atttattttg	gtattgtctg	cctgcatccc	21180
aagaaggtga	agtctttggg	gatgaagggt	ttatcttatt	tcctgcataa	tatcaaactt	21240
ctaaaaagtt	cctaggactc	aataggcatt	taataaacac	ctatcagata	aatgaatttt	21300
ttaagagaac	acattacata	atgctttcta	atagcaatac	agtgacaaac	tttattttta	21360
agtaaattaa	tgcaaatatg	tatattattt	aaaattgttt	gtttttaaga	taacaagcct	21420
gatagataat	aaattttggc	ataaatatgt	taatgcttat	caaaactcat	cagtacatat	21480
cctgtctttt	gatgaaaaag	taatagaaa	gggagaacaa	agagaactct	catgctcact	21540
aggcaggccg	agtgcagctc	tgacagcaat	gcaagagaaa	tattactatc	tccatcatat	21600
gcaggatgaa	atthaggtct	ggagaaaaca	acacttcgtt	aaagatttta	tagctgtctca	21660
agatttgacc	aaggctttta	aaacttcaaa	tgttcttttc	cttattacac	tgtttcttat	21720
caggatttgt	ggactttgga	aagtaaaatg	aaaagtcaga	gcaatgtgag	ttagtttgat	21780
aatctcagtg	gccagtaaca	gctatcccca	ctctgaatat	ataccaacca	acctctcccc	21840
tttctccaag	gaagttagtt	cttggaag	gcatttcag	cagtgtactt	tgctattcta	21900
accttccttt	ttttttgtat	gctcctgttg	ctaatcatcc	tatttctatg	ggcttcagtc	21960
actcttttag	cttttgtctt	gggagacttt	ctgtctgttg	acatgacttt	taaaataatc	22020

ES 2 547 471 A1

ttctcccca	ttgtatttat	atctcattag	cctaccccc	ctccccttgt	gttttagaag	22080
agttttattg	tctgtcatcc	ctctatagtt	cccaccctgt	tacctgcccg	tgtcctgttc	22140
aaacacttgc	tccttttttc	cttgggcagg	tgaaaggaaa	gctagggact	gcacagtcaa	22200
tggggatgaa	ccagactgcg	tgccctgcca	agaagggaag	gagtacacag	acaaagccca	22260
tttttcttcc	aaatgcagaa	gatgtagatt	gtgtgatgaa	ggacatggta	agagtcttaa	22320
aatgcaattg	aaagaggcca	atcttggaat	ttcatgtaga	accatttata	agacaatttg	22380
aaattggggc	ctactgtggg	gctatgttga	cacacaggaa	agggaaggac	aggtggctag	22440
ggtaccgcag	aaccagggtgc	cgagctaact	actgggtctag	acctttatga	gtaagtctag	22500
gcaattcttc	cagatatagg	agaatgagta	aatatgaacc	ctaggaacag	ggttcatcag	22560
ctcaaataca	aagctcagaa	attatTTTTT	ttctggcctt	gacttacgct	tatataatgg	22620
tgctcgttca	tgGCCAGAAA	aattcagaag	cctgcagata	caaggacaca	gaaatccaaa	22680
aggtaggtag	gaatgctccc	cTTTTCTTTG	gggatttagt	ttgtcctgat	aattccatct	22740
ggggacctga	attttcatgg	atatctcaat	gtattctaag	gaccagatt	gaagtataac	22800
agaagtgttt	ctagttttgt	ttgacatgaa	gaaacctctg	gacataaagc	ttttcccatc	22860
cctattcagc	ctataaagca	atgtttctca	tcctggcgag	tgcattagaa	ttgcttaggg	22920
agctactaaa	aatgtttcat	gtttaggtcc	catctcaggg	caattacatc	agagtctctg	22980
agtgaggacc	ttgggtattgg	cctgatggag	taagtctggg	gtagagccta	acattctaca	23040
ttttaacaa	gctcccaggt	gatgctcatg	ctgccagtcc	ccaggtcacc	ctttgagtgt	23100
taaggctaga	gactagagga	acaggggaga	cgtctaagta	ttggtgaggt	ttgtcttggg	23160
tgctgctaaa	tgattgctgg	ccatttcaac	ctggggTTTT	ctgttctgtg	tttaaact	23220
gactgtatta	ctgggtgcat	gctgtgactg	ttgatataag	cagtggatct	caaaaatcca	23280
tgagctcct	gcccaccatt	ttcatagtct	gcttataatt	agccgctata	actaatagtt	23340
tccaaactga	ttttctaggc	ttagaagtgg	aaataaactg	caccgggacc	cagaatacca	23400
agtcagatg	taaaccaaac	tttttttgta	actctactgt	atgtgaacac	tgtgaccctt	23460
gcaccaagta	agtttttagtc	tttctctgat	taaaacacta	gatataacat	gagagttatc	23520
attttcctag	ggaagtaaca	ctgactgaga	gttaagaatt	agggttctag	tcctgctttg	23580
cctccaagca	actagatgac	tgtttgctca	tttaaact	gggtgaacttc	ctgtgtaggt	23640
gacactttgc	tggccactta	agctaaagat	atgagccaga	catatgcctg	gcatcaaggt	23700
atcagtcag	aagcacagac	agtcaaggaa	agcaatgggt	attgtgtttc	aacagcatga	23760
gaatagcatc	agaagagact	tatgttccag	gtgttacaaa	ttatacagaa	aaacttttca	23820
actctgcctg	aggagatgga	gggtgaagaca	tgaatgtgtc	tcatgacttg	aatcttgaag	23880
aaagaaaaga	aagagcatta	acaggtgcac	atggatggaa	tgcacattat	aggcagggaa	23940
acagcagctg	caaagagaca	aaggaagctc	aggaaaacag	aatacctggc	tggagtgtag	24000
gaaagactga	gaagcgttca	gggctgaatc	atgaagggcc	ttgtctttta	ggctaaagag	24060

ES 2 547 471 A1

gttggttttg	acccaaagtt	agagaacctg	ccttgtaagt	catcttgga	agcttttagg	24120
agttcatcta	ataggcttaa	gaaataagca	catgatgcct	tatgttttat	ttgctaggaa	24180
aattttatgt	acagttgtcc	caggctctcc	cctggccaca	agtgtctgag	agtgcccta	24240
tgatgacagg	ctaggtaggc	attggggaag	cagctgactt	agtaaaataa	taacaataat	24300
agtaattcca	aatatttcat	aatcttgatt	taattttctt	gtcatcataa	ccttttgaaa	24360
tagataatat	tatttccatg	ttattgatga	gataaaaggc	tcatggcagt	gtgacttccc	24420
aagctcacct	agtcaggtaa	tgggcagagg	ctgtgaactc	agacaacctg	attgtgaatg	24480
tttgtctgtc	tgaaggaaat	cacacatgaa	cctcttgagt	ctcctgatca	ccaccggttg	24540
ctaaaagtgg	cagcctctaa	gggccagctg	agtaccctcc	ctgagctaca	tcatgggcgt	24600
ggctatcacc	tggccatttt	cttgggtctat	aggaattttt	tgaaattact	tttgacagtt	24660
tattttaaga	gctagttaa	gctataggat	ttacgtgttc	agtttattac	taggtttaag	24720
tttatttttg	tatccacttc	atctctcttg	tgtgtcacta	ttttcctatc	ttcctttaac	24780
tcttgaaatc	ttaagacaga	gtcattcctt	atgatatttt	tcatccagcc	atccaaatta	24840
tattaacttg	tgccagcttt	agatacta	ttagaaatat	ttgaaggaa	acgtttgcca	24900
gagatgcaaa	gatgaataaa	atggccccta	atttacaag	tgccattgaa	aattataaag	24960
gaattattct	gccaggcttt	tgaatttctc	ctgtattttt	ttttctagat	gtgaacatgg	25020
aatcatcaag	gaatgcacac	tcaccagcaa	caccaagtgc	aaagaggaag	gtaattattt	25080
ttttacgggt	atattctcct	ttcccccaac	cccatggaaa	gatgtgaaga	aaaaccaatc	25140
actcttgatt	actagaaagt	cctttattta	atcttaaaga	ttgcttattt	tcataataaa	25200
tgtccaatgt	tccaacctac	aggatccaga	tctaacttgg	ggtggctttg	tcttcttctt	25260
ttgccaattc	cactaattgt	ttggggtaag	ttcttgcttt	gttcaaactg	cagattgaaa	25320
taacttggga	agtagttcac	aaagatttgc	ctcattctta	cctataaaaa	gctaccactt	25380
tggtagattt	atgtattgtt	aatttcttgc	ccctgaatgc	agccttgaga	gctgactgat	25440
aagaacaaat	gaaattattc	ctcagctagt	ttctgagcaa	cagttttggg	gcattgagtg	25500
gtattctcat	ccttcctatg	aacagggtgt	ctctgcagca	gcagaattgg	ccaaaaatca	25560
gaagcaattc	ttcactattc	attgagatct	ccctatgcaa	aaagagaaca	caagaagcaa	25620
aggcattccc	aggaaacaca	ttgcagggaa	cactttaaaa	acttgtactt	cactgcctcc	25680
tcttcctcgg	cctaattgct	tgtttttaat	tatttctcct	tcttaactta	aaatactatg	25740
gggacacatg	ttatacaaag	gtgacttagt	agagtcagta	gaaaagccaa	aattagatat	25800
tatcataatt	agtctagaaa	aatcccttta	agtcattcat	caactacagg	gtcacaccaa	25860
ctttcagtaa	cttagaagta	ttcaattttc	ccttctcaga	acaattatct	gtttcttcag	25920
ttcagttgaa	gaagaaagtt	tgccttgcct	ttagcgggtg	tttagctgaa	aatacatttg	25980
ggatatttaa	gcactgtaat	tgtgctcaga	gacatacaga	ttcttctatc	tcacattgac	26040
tttaatgcat	acacctattg	agtatgtatg	cttgagttat	ttgtgtgtgt	atttcatttc	26100
tgggcatcca	tagcaagttg	atgttgactt	gcttgtccta	cggcttctgc	atcctgccat	26160

ES 2 547 471 A1

agtcttgccg	tccacatctt	tgctggacag	agagtgggtgc	ttgccatatg	gtaagtcaaa	26220
agccatctcc	ttgctaggcc	agcctgtggt	aattagatga	ctaattaaga	tatgtccttt	26280
cactagaaca	cttgacttag	tagtacgaaa	gttccaaaat	cagcgggtctc	ctgcatgtt	26340
tggccacttt	taagtttcac	tgaatttctc	ctttttcctt	cttatatttc	tcttagtgtg	26400
aaagtatgtt	ctcacatgca	ttctacaagg	ctgagacctg	agttgataaa	atttctttgt	26460
tctttcagt	aagagaaagg	aagtacagaa	aacatgcaga	aagcacagaa	agggaaaacca	26520
aggttctcat	gaatctccaa	ctttaaatcc	tgtaggtatt	gaaataggta	tcagctttcc	26580
ttgaaaagaa	aaatagagaa	attagtgtt	tggctttttg	ttacttcctt	ttactttttt	26640
gtttcttggt	tgtttcattt	tgtttgagat	ggagtcttgc	tccatagccc	aggctggagt	26700
gcaggggtgc	aatcatggct	cactgcagcc	tcaaagtcct	gggctcaagt	gatcctcctg	26760
cctcaactgt	gaccctggga	ctacaggcat	gcaccaccat	gccagggttaa	ttttttattt	26820
ttatttttta	tagagacagg	gttcactttg	ttgcccaggc	tgggtctcaa	cttttgacct	26880
caagcaatcc	ttctgcctca	gcctcccaaa	gttctgggat	tataggtgtg	agccatcaca	26940
tccggcctgt	tactttcttt	atttaaacad	tgcttgtgtt	tgtgggtgca	taggttaaag	27000
gggcctcaca	gatgaattat	gatatggtac	ccaaattaaa	agtaaacttg	tacacaaaaa	27060
ccgtaagaat	caacaaagga	gggaattgag	agtgtgctga	aatgagctg	aaaaaagaac	27120
ttggccaacc	tccatgttcc	gtgttgttgt	tatccctgca	gagaaacagc	ctttaccagg	27180
catgggttca	gtatccaagc	ctgagcaaag	agattgctct	taaagtttgt	cataagggca	27240
cagcttaact	ttctctggct	gccggttgac	cttatgtctc	accatatctt	ttcccaacat	27300
ggtatcaata	tatttcagat	agcaagaaat	acaccgagaa	aagaaaccag	ttgcacttaa	27360
tggaattatt	ttcttatttg	gggccagggc	tcagtgggag	ttaggattct	ttaaattaat	27420
atggtaaaaa	aaatttcaat	ttgagccatt	ttctggtatt	aagaataaga	atagttacag	27480
ggaagaaaat	tttagagtag	ttatatattt	tatttatattt	aataagtcta	tatgaaaaat	27540
aacctcaacc	tattttatga	attcttttag	tttcttgcct	ttaaaaaacta	agacaatatt	27600
gcttagtttc	tggcaaggcc	ggaacctttc	agaataaaaa	ttgaatggta	aaagtaacct	27660
tcttaatcac	ttaatctagc	ttcctaattt	tatacatcaa	gcaactgatt	gtacttcttt	27720
ctgaattaag	gaaaaattag	aagttcacat	ttagaatatt	ctaaagatat	attttttattt	27780
gtctttctct	gcttccattt	tttgctttct	aggaaacagt	ggcaataaat	ttatctggta	27840
aggcttttat	cattttattt	catagagatg	gcacccctta	gagtaatagg	ccaatttcag	27900
agtaaaataa	tgttactaat	ttcagtgaca	tattatggga	tcttgttatt	tctcatacaa	27960
ttctacctgc	tcagcataaa	gcatttatca	ggcagtttgt	ttaaatttat	aatgaatact	28020
catagttaaa	aataatcaag	taacaataag	acacaatagt	ctgaggctta	agaaactttt	28080
ccttcataat	cagctagatg	tattacagaa	ctcctgccta	aaaagatcta	gagggttaaag	28140
tgtactgtag	actcaggtat	tatcagtgtg	cccaactcta	taacaacata	catgattcca	28200

ES 2 547 471 A1

ttcagttggt	ctttgatctg	tgatttagag	ataagatgat	cataaactct	ttgcttatac	28260
tttttagattt	gtgggtcatt	gatcattgga	tccataagag	atgttatagg	tgatcttttc	28320
caatcctctt	aatttataaa	tgagaaaaga	agatacagaa	atgttatgta	ttgtggccca	28380
ggttatttta	caaattactg	ggtatatggc	aggatttgga	gttagaactc	aaggttgtct	28440
tgtttctgta	ttcccctagt	cagctcttca	tagaccttta	ggacttagct	atattctgaa	28500
gtactataaa	aagagaaata	aacatggttt	tcactaatgg	gaatttcatt	tagaaaaaca	28560
aattttcaga	ctattttcta	tttttcagat	gttgacttga	gtaaataatat	caccactatt	28620
gctggagtca	tgacactaag	tcaagttaaa	ggctttgttc	gaaagaatgg	tgtcaatgaa	28680
gccaaaatag	atgagatcaa	gaatgacaat	gtccaagaca	cagcagaaca	gaaagttcaa	28740
ctgcttcgta	attggcatca	acttcatgga	aagaaagaag	cgtatgacac	attgattaaa	28800
gatctcaaaa	aagccaatct	ttgtactctt	gcagagaaaa	ttcagactat	catcctcaag	28860
gacattacta	gtgactcaga	aaattcaaac	ttcagaaatg	aaatccaaag	cttgggtctag	28920
agtgaaaaac	aacaaattca	gttctgagta	tatgcaatta	gtgtttgaaa	agattcttaa	28980
tagctggctg	taaatactgc	ttggtttttt	actgggtaca	ttttatcatt	tattagcgct	29040
gaagagccaa	catatttgta	gatttttaat	atctcatgat	tctgcctcca	aggatgttta	29100
aaatctagtt	gggaaaacaa	acttcatcaa	gagtaaattgc	agtggcatgc	taagtaccca	29160
aataggagtg	tatgcagagg	atgaaagatt	aagattatgc	tctggcatct	aacatatgat	29220
tctgtagtat	gaatgtaatc	agtgtatgtt	agtacaaatg	tctatccaca	ggctaacccc	29280
actctatgaa	tcaatagaag	aagctatgac	cttttgctga	aatatcagtt	actgaacagg	29340
caggccactt	tgcttctaaa	ttacctctga	taattctaga	gattttacca	tatttctaaa	29400
ctttgtttat	aactctgaga	agatcatatt	tatgtaaagt	atatgtattt	gagtgcagaa	29460
tttaaataag	gctctacctc	aaagaccttt	gcacagttta	ttgggtgtcat	attatacaat	29520
atttcaattg	tgaattcaca	tagaaaacat	taaattataa	tgtttgacta	ttatatatgt	29580
gtatgcattt	tactggctca	aaactaccta	cttctttctc	aggcatcaaa	agcattttga	29640
gcaggagagt	attactagag	ctttgccacc	tctccatttt	tgctttgggtg	ctcatcttaa	29700
tggcctaattg	cacccccaaa	catggaaata	tcaccaaaaa	atacttaata	gtccacccaaa	29760
aggcaagact	gcccttagaa	attctagcct	ggtttgagaga	tactaactgc	tctcagagaa	29820
agtagctttg	tgacatgtca	tgaacccatg	tttgcaatca	aagatgataa	aatagattct	29880
tattttttccc	ccacccccga	aatgtttcaa	taatgtccca	tgtaaaacct	gctacaaatg	29940
gcagcttata	catagcaatg	gtaaaatcat	catctggatt	taggaattgc	tcttgtcata	30000
cccccaagtt	tctaagattt	aagattctcc	ttactactat	cctacgttta	aatatctttg	30060
aaagtttgta	ttaaatgtga	attttaagaa	ataatattta	tatttctgta	aatgtaaact	30120
gtgaagatag	ttataaactg	aagcagatac	ctggaaccac	ctaaagaact	tccatttatg	30180
gaggattttt	ttgccccttg	tgtttggaat	tataaaatat	aggtaaaagt	acgtaattaa	30240
ataatgtttt	tggtatttct	ggttttctct	tttttggtag	gggcttgctt	tttggttttg	30300

ES 2 547 471 A1

tcttcctttt	ctctaactga	tgctaaatat	aacttgtctt	taatgcttct	tggatccctt	30360
agaaggtagt	tcctttttta	ccttaaccct	tttagtagtt	aaataattat	ttccataggt	30420
tgctattgcc	aagaagacct	cttccaaaca	gcacatgatt	attcgtcaaa	cagtttcgta	30480
ttccagatac	tggaatgtgg	ataagaaagt	atacatttca	aggggtaggt	tttattatta	30540
agaaagccaa	atgaggattt	tgaaatattc	tttctgcat	attatccatt	ctagctacat	30600
gctggccagt	gggccacctt	tcttttctgc	aatttaatgc	tagtaatata	ttctatttta	30660
cccatgagtc	ccaaagtatt	agcatttcaa	catgtaagca	tgctcgtaag	atagttgtgc	30720
tttgcttagg	gttcctcct	gtgttatgg	ctggaaagt	tctttaggca	gaaagtctga	30780
gtgatcacag	ggttcactca	ttaatttctc	ttttctgagc	catcatagtc	tgtgctgtct	30840
gctctccagt	tttctatttc	tagacagaag	tagggcaagt	taggtactag	ttattcttca	30900
tggccagaag	tgcaagttct	actttgcaag	acaagattaa	gttagagaac	accctattcc	30960
actttggtga	actcagagca	agaactttga	gttcctttgg	gaggaagaca	gtggagaagt	31020
ctttgtactt	ggtgatgtgg	tttttttct	catggcttca	cctagtggcc	ccaagcatga	31080
cttctcccat	gtcaatgagc	acagccacat	tcccagattg	aggtgacccc	acgggtccaga	31140
atcatcctca	ttctggtgaa	cctggttctc	tttgtggtgg	gcatactggg	taggagaatc	31200
acccaaaggt	cacccatgag	ctgcagaaaa	aaaggctatt	tgcagaagga	gctcacagat	31260
cacattgaaa	gcattgcata	ttcaaacatc	ttggctcttct	ttattggcat	gccacaggg	31320
tcttctgacc	tctgattaga	tcagacactt	tttagatatt	gaatcatcag	tttctgtaca	31380
actatctgaa	taaggatat	aatcaatgaa	atttagaatt	tttttctatg	cttactcctg	31440
attggttaatt	tgtttgggtt	tagaattcta	tacaaggcca	tttgtaattt	tcctcagcac	31500
tttaaaaata	ttaaaccatg	ttttcttaac	atctgttgct	gttgattatg	tctgctcttg	31560
gtgtaaatat	cattcctttg	taggtaatt	gtaatttttt	ttcctctggt	aattttttaa	31620
gcttccccct	ctactttcct	atgtgttctg	cagtttcaca	acaatgactt	tcaatgtgta	31680
tttattttta	cttaattctat	ttaataagat	ttaattagaa	aggcagggct	ttcatcattt	31740
ctggaaaaaa	tcccagctat	tttctcttta	aatagtgttt	ctttaccatt	ctcattctct	31800
tcttctgaaa	ctgttggtat	tatttggtga	agcttcttga	gttattttct	aggtctctta	31860
atttttttta	aaacaataat	tgtctccgta	tgttgcattt	taggaaattt	ctcattactc	31920
tttttaaatt	aactgttagt	ttttactaag	cccggctaga	atagtctatc	cactgaggta	31980
tgtattttgt	tttctatatt	tttcattctt	aatgtttctt	attgttcctt	ttacattttt	32040
acttgatat	gtttcattcc	tgcttttttt	aattttcttt	cttctttccc	ttttctctct	32100
tttttttttt	cttcttgag	tgagacaga	ctttattagt	acagcagagg	tgccacaga	32160
gcaggcagaa	gggatcagt	cctggatctg	tcccttcctc	cttctgccct	cgctgagccc	32220
tagtgtgtcc	ggaattggtg	ggttcttggt	ctcac			32255

ES 2 547 471 A1

<211> 1202
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..1202
<223> /mol_type="mRNA"
/note="mutación c.979T>G del gen Fas"
/organism="Homo sapiens"

```
<400> 2
gacgcttctg gggagtgagg gaagcggttt acgagtgact tggctggagc ctcaggggcg      60
ggcactggca cggaacacac cctgaggcca gccctggctg cccaggcgga gctgcctctt      120
ctcccgcggg ttggtggacc cgctcagtac ggagttgggg aagctctttc acttcggagg      180
attgctcaac aaccatgctg ggcatctgga ccctcctacc tctggttctt acgtctgttg      240
ctagattatc gtccaaaagt gttaatgcc aagtgactga catcaactcc aagggattgg      300
aattgaggaa gactgttact acagttgaga ctcagaactt ggaaggcctg catcatgatg      360
gccaattctg ccataagccc tgtcctccag gtgaaaggaa agctagggac tgcacagtca      420
atggggatga accagactgc gtgccctgcc aagaagggaa ggagtacaca gacaaagccc      480
atttttcttc caaatgcaga agatgtagat tgtgtgatga aggacatggc ttagaagtgg      540
aaataaactg caccgggacc cagaatacca agtgcagatg taaaccaaac tttttttgta      600
actctactgt atgtgaacac tgtgaccctt gcaccaaatg tgaacatgga atcatcaagg      660
aatgcacact caccagcaac accaagtgca aagaggaagg atccagatct aacttggggt      720
ggctttgtct tcttcttttg ccaattccac taattgtttg ggtgaagaga aaggaagtac      780
agaaaacatg cagaaagcac agaaaggaaa accaagggtt tcatgaatct ccaaccttaa      840
atcctgaaac agtggcaata aatttatctg atgttgactt gagtaaatat atcaccacta      900
ttgctggagt catgacacta agtcaagtta aaggctttgt tcgaaagaat ggtgtcaatg      960
aagccaaaat agatgagagc aagaatgaca atgtccaaga cacagcagaa cagaaagttc     1020
aactgcttcg taattggcat caacttcatg gaaagaaaga agcgtatgac acattgatta     1080
aagatctcaa aaaagccaat ctttgtactc ttgcagagaa aattcagact atcatcctca     1140
aggacattac tagtgactca gaaaattcaa acttcagaaa tgaaatccaa agcttgggtct     1200
ag                                                                    1202
```

<210> 3
<211> 1203
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..1203
<223> /mol_type="mRNA"
/note="mutación c.827dupA del gen Fas"
/organism="Homo sapiens"

```
<400> 3
gacgcttctg gggagtgagg gaagcggttt acgagtgact tggctggagc ctcaggggcg      60
```

ES 2 547 471 A1

```

ggcactggca cggaacacac cctgaggcca gccctggctg cccaggcgga gctgcctctt 120
ctcccgcggg ttggtggacc cgctcagtac ggagttgggg aagctctttc acttcggagg 180
attgctcaac aaccatgctg ggcatctgga ccctcctacc tctggttctt acgtctgttg 240
ctagattatc gtccaaaagt gttaatgccc aagtgactga catcaactcc aagggattgg 300
aattgaggaa gactgttact acagttgaga ctcagaactt ggaaggcctg catcatgatg 360
gccaatcttg ccataagccc tgtcctccag gtgaaaggaa agctagggac tgcacagtca 420
atggggatga accagactgc gtgccctgcc aagaagggaa ggagtacaca gacaaagccc 480
atttttcttc caaatgcaga agatgtagat tgtgtgatga aggacatggc ttagaagtgg 540
aaataaactg caccgggacc cagaatacca agtgcagatg taaaccaaac tttttttgta 600
actctactgt atgtgaacac tgtgaccctt gcaccaaagtg tgaacatgga atcatcaagg 660
aatgcacact caccagcaac accaagtgca aagaggaagg atccagatct aacttggggg 720
ggctttgtct tcttcttttg ccaattccac taattgtttg ggtgaagaga aaggaagtac 780
agaaaacatg cagaaagcac agaaaggaaa accaagggtt tcatgaaatc tccaacctta 840
aatcctgaaa cagtggcaat aaatttatct gatgttgact tgagtaaata tatcaccact 900
attgctggag tcatgacact aagtcaagtt aaaggctttg ttcgaaagaa tgggtgtcaat 960
gaagccaaaa tagatgagat caagaatgac aatgtccaag acacagcaga acagaaagtt 1020
caactgcttc gtaattggca tcaacttcat ggaaagaaag aagcgtatga cacattgatt 1080
aaagatctca aaaaagccaa tctttgtact cttgcagaga aaattcagac tatcatcctc 1140
aaggacatta ctagtgactc agaaaattca aacttcagaa atgaaatcca aagcttggtc 1200
tag 1203

```

```

<210> 4
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /mol_type="unassigned RNA"
      /note="Hebra sentido del siRNA dirigida al alelo mutado del gen
      Fas portador de la mutación c.979T>G"
      /organism="Artificial Sequence"

```

```

<400> 4
uagaugagag caagaatgat t 21

```

```

<210> 5
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<221> source
<222> 1..21
<223> /mol_type="unassigned RNA"
      /note="Hebra sentido del siRNA dirigida al alelo mutado del gen

```

Fas portador de la mutación c.827dupA"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 5
gguucucaug aaaucuccat t 21

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="unassigned DNA"
/note="Cebador directo del gen Fas"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 6
cccgctcagt acggagttgg 20

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..23
<223> /mol_type="unassigned DNA"
/note="Cebador inverso del gen Fas"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 7
ccaagttaga tctggatcct tcc 23

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="unassigned DNA"
/note="Cebador directo del gen Fas"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 8
cccttgacc aaatgtgaac atgg 24

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..22
<223> /mol_type="unassigned DNA"
/note="Cebador inverso del gen Fas"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 9
ccaagcagta tttacagcca gc 22

<210> 10
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="hebra sentido del siRNA dirigida frente a la secuencia
 wild-type del gen Fas (siRNA-WT)mRNA"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 10
 uagaugagau caagaatgat t 21

<210> 11
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra antisentido del siRNA dirigida al alelo mutado del
 gen Fas portador de la mutación c.979T>G"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 11
 ttaucuacuc uccuucuuac u 21

<210> 12
 <211> 2
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra sentido del siRNA con 2 mismatch dirigida al alelo
 mutado del gen Fas portador de la mutación c.979T>G"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 12
 uagaugagag aaagaatgat t 21

<210> 13
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra antisentido del siRNA con 2 mismatch dirigida al
 alelo mutado del gen Fas portador de la mutación c.979T>G"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 13
 ttaucuacuc ucuuucuuac u 21

<210> 14
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra sentido del siRNA modificada en 3' dirigida al alelo
 mutado del gen Fas portador de la mutación c.979T>G"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 14
 uagaugagag caagaatggt t 21

 <210> 15
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra antisentido del siRNA modificada en 3' dirigida al
 alelo mutado del gen Fas portador de la mutación c.979T>G"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 15
 ttaucucacuc uccuucuuac u 21

 <210> 16
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra antisentido del siRNA dirigida al alelo mutado del
 gen Fas portador de la mutación c.827dupA"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 16
 ttccaagagu acuuuagagg u 21

 <210> 17
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra sentido del siRNA con 2 mismatch dirigida al alelo
 mutado del gen Fas portador de la mutación c.827dupA"
 /organism="Artificial Sequence"

 <400> 17
 gguucucaug acaucuccat t 21

<210> 18
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra antisentido del siRNA con 2 mismatch dirigida al
 alelo mutado del gen Fas portador de la mutación c.827dupA"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 18
 ttccaagagu acuguagagg u 21

<210> 19
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra sentido del siRNA modificada en 3' dirigida al alelo
 mutado del gen Fas portador de la mutación c.827dupA"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 19
 gguucucaug aaaucuccgt t 21

<210> 20
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <222> 1..21
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Hebra antisentido del siRNA modificada en 3' dirigida al
 alelo mutado del gen Fas portador de la mutación c.827dupA"
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 20
 ttccaagagu acuuuagagg u 21

<210> 21
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> 1..37
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Secuencia de nucleótidos del mRNA del Alelo wild type del
 gen Fas en la región de la mutación c.979T>G"
 /organism="Homo sapiens"

<400> 21
 agccaaaata gatgagatca agaatagacaa tgtccaa 37

<210> 22

<211> 37
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> 1..37
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Secuencia de nucleótidos del mRNA del Alelo mutado
 (c.979T>G) del gen Fas en la región de la mutación"
 /organism="Homo sapiens"

<400> 22
 agccaaaata gatgagagca agaatagacaa tgtccaa 37

<210> 23
 <211> 37
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> 1..37
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Secuencia de nucleótidos del mRNA del Alelo wild type del
 gen Fas en la región de la mutación c827dupA"
 /organism="Homo sapiens"

<400> 23
 gaaaaccaag gttctcatga atctccaacc taaatcc 37

<210> 24
 <211> 38
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> source
 <222> 1..38
 <223> /mol_type="unassigned RNA"
 /note="Secuencia de nucleótidos del mRNA del Alelo mutado
 (c.827dupA) del gen Fas en la región de la mutación"
 /organism="Homo sapiens"

<400> 24
 gaaaaccaag gttctcatga aatctccaac ctaaattcc 38



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

- ②① N.º solicitud: 201430504
②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.04.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A61K31/7105** (2006.01)
A61P37/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 2005013886 A2 (BLOOD RES CENTER et al.) 17.02.2005, todo el documento.	1-11
Y	DEL-REY et al. "Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a patient with a new germline Fas gene mutation" IMMUNOBIOLOGY, 20070302 Urban und Fischer Verlag, DE 02.03.2007 VOL: 212 No: 2 Págs: 73-83 ISSN 0171-2985 Doi: doi:10.1016/j.imbio.2006.12.003 Rajnavolgyi Eva; Nagy Laszlo; todo el documento.	1-11
A	FISHER et al. "Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative síndrome" CELL, 19950601 CELL PRESS, US 01.06.1995 VOL: No: 81 Págs: 935-946 ISSN 0092-8674 Doi: doi:10.1016/0092-8674(95)90013-6; todo el documento.	1-11
A	KUEHN HYE SUN et al. FAS Haploinsufficiency Is a Common Disease Mechanism in the Human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. Journal of Immunology MAY 15 2011 (05.2011) VOL: 186 No: 10 Págs: 6035-6043 ISSN 0022-1767 Doi: doi:10.4049/jimmunol.1100021; todo el documento.	1-11
A	HSU AMY P et al. "Autoimmune lymphoproliferative syndrome due to FAS mutations outside the signal-transducing death domain: molecular mechanisms and clinical penetrance" Genetics in Medicine ENERO 2012 (01.2012) VOL: 14 No: 1 Págs: 81-89 ISSN 1098-3600(print) ISSN 1530-0366(electronic) Doi: doi:10.1038/gim.0b013e3182310b7d; todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.06.2015

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NCBI, EMBL-EBI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, XPESP, EMBASE/ELSEVIER, y Bases de texto completo TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.06.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2005013886 A2 (BLOOD RES CENTER et al.)	17.02.2005
D02	DEL-REY et al. "Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a patient with a new germline Fas gene mutation" IMMUNOBIOLOGY, 20070302 Urban und Fischer Verlag, DE 02.03.2007 VOL: 212 No: 2 Pags: 73 - 83 ISSN 0171-2985 Doi: doi:10.1016/j.imbio.2006.12.003 Rajnavolgyi Eva; Nagy Laszlo.	02.03.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, según se recoge en las reivindicaciones 1-11, es el uso de un iRNA específico de un alelo mutado del FAS asociado al síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLPA) de tipo IA, una secuencia de nucleótidos, un vector o una célula que comprendan dicho iRNA, para la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento del SLPA (reiv. 1-5). Es también objeto de la invención un método para determinar la utilidad de un tratamiento con un iRNA en un paciente que padece SLPA de tipo IA (reiv. 6-11).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

Las secuencias SEQ ID NO: 2 y 3 están divulgadas en la base de datos GeneBank, con los números de acceso AY495076 y EU481974.2 respectivamente. Además, la secuencia SEQ ID NO: 2 está divulgada en el documento D02.

En el estado de la técnica no se han encontrado divulgadas las secuencias SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

El documento D01 divulga el uso de RNAi (siRNA y shRNA) en la elaboración de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con defectos en las rutas apoptóticas (por ejemplo enfermedades autoinmunes, cáncer o enfermedades inflamatorias), mediante la inhibición de genes apoptóticos, entre ellos el gen FAS. El RNAi puede estar dirigido frente a una mutación específica del gen, silenciando o inhibiendo de esta forma únicamente la expresión del alelo mutado del gen. Este documento también divulga un método para evaluar la idoneidad del tratamiento en un paciente determinado, y un método para la obtención del tratamiento adecuado a cada paciente, mediante el diseño de un RNAi dirigido a la mutación específica del gen defectuoso que porta el paciente.

Aunque en el documento D01 no se indican mutaciones específicas del gen FAS, o su relación con el SLPA de tipo Ia, esto se encuentra divulgado en el documento D02. Este documento D02 describe la relación entre la mutación I246S del dominio DD ("death domain") con dicho síndrome. Además, en este documento se indica que las mutaciones en el nucleótido 979 también se relacionan con el SLPA. Debido a la naturaleza de estas mutaciones en el gen FAS, sería obvio para un experto en la materia obtener por medios rutinarios un RNAi específico frente a dichas mutaciones y utilizarlo para elaborar una composición farmacéutica para el tratamiento de SLPA, tal y como se indica en el documento D01, y obtener el objeto de la invención con una expectativa más que razonable de éxito.

Por lo tanto, y a falta de un efecto técnico inesperado, el objeto de la invención definida en las reivindicaciones 1-11 aunque es nueva en el sentido del art. 6.1 LP, carece de actividad inventiva en el según el sentido del art. 8.1 LP.