

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 713**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2016** **PCT/IB2016/051676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016** **WO16151523**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2016** **E 16712085 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020** **EP 3274456**

54 Título: **Terapia mediada por ARN interferente para enfermedades neurodegenerativas**

30 Prioridad:

25.03.2015 IT TO20150185

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

22.04.2021

73 Titular/es:

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRENTO (100.0%)

Via Calepina 14

38122 Trento, IT

72 Inventor/es:

COVELLO, GIUSEPPINA;

DENTI, MICHELA ALESSANDRA y

SIVA, KAVITHA

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 820 713 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Terapia mediada por ARN interferente para enfermedades neurodegenerativas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a la terapia mediada por ARN interferente para enfermedades neurodegenerativas asociadas con anomalías de la proteína tau asociada a los microtúbulos.

Antecedentes de la invención

La modulación de la expresión génica por ARN endógenos no codificantes se han apreciado cada vez más y se sabe que desempeña un papel en el desarrollo eucariota y el control epigenético. Recientemente, se han desarrollado procedimientos para desencadenar ARN interferente (ARNi) contra dianas específicas en células de mamíferos mediante la introducción de pequeñas moléculas de ARN interferente (ARNip) producidas exógenamente o expresadas intracelularmente.

Se ha demostrado que estos rápidos procedimientos económicos y efectivos son efectivos para experimentos de disminución de expresión *in vitro* e *in vivo*. La capacidad de lograr tal silenciamiento génico selectivo ha llevado a la hipótesis de que los ARNip se pueden usar para suprimir la expresión génica con fines terapéuticos. Los candidatos ideales para un abordaje de ARNip de este tipo serían las enfermedades de herencia dominante.

Estudios recientes realizados por Miller V y col.¹ han demostrado que los ARNip pueden usarse para atacar enfermedades neurodegenerativas intratables, tal como la neurodegeneración de poliglutamina (polyQ) en la enfermedad de Machado-Joseph, la ataxia espinocerebelosa de tipo 3 (MJDSCA3) y la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17). Estos estudios se han centrado exclusivamente en el silenciamiento selectivo de la transcripción producida por el alelo mutante¹. El ARN interferente ha demostrado ser una estrategia eficaz para silenciar el alelo tau mutante V337M, sin embargo, el agotamiento selectivo del alelo mutante no se logró por completo en el estudio porque hubo un agotamiento parcial del alelo de tipo silvestre de tau¹. Más recientemente, se ha descrito otro ejemplo de ARNip dirigido a MAPT², en el que se analizó una mezcla de cuatro ARNip destinados a suprimir todas las isoformas de tau en un modelo de tauopatía de ratón.

El gen MAPT (proteína tau asociada a microtúbulos) consiste en 16 exones y su expresión está regulada por un corte y empalme alternativo complejo. Esto da como resultado la producción de dos tipos de transcripciones sometidas a corte y empalme alternativamente: uno que porta el exón 10, también conocido como isoforma 4R (cuatro repeticiones de microtúbulos) y el otra que carece del exón 10 se denomina isoforma 3R (tres repeticiones de microtúbulos). En el cerebro adulto humano normal se expresan niveles iguales de estas dos isoformas. Aunque en MAPT se conocen varias mutaciones que causan FTDP-17, la mitad de las cuales afectan al corte y empalme alternativo del exón 10. Estas incluyen mutaciones de sentido erróneo, mutaciones silenciosas y mutaciones puntuales que se encuentran en el exón 10, los intrones 9 y 10. Se sabe que implican un aumento en el exón 10 que provoca una acumulación excesiva de 4R. Esto conduce a la formación de ovillos neurofibrilares, lo que da como resultado neurodegeneración.

Vale la pena mencionar que las anomalías de tau están vinculadas a la patogenia de la enfermedad neurodegenerativa, denominada colectivamente "tauopatías", y en los cerebros con EA (enfermedad de Alzheimer) hay niveles significativamente elevados de tau.

Se han utilizado algunos abordajes para la corrección de la inclusión del exón 10 en FTDP-17:

- Moléculas pequeñas: se ha realizado un cribado que dio esteroides cardiotónicos como fármacos moduladores del corte y empalme del exón 10, aunque no específicos,³ y
- Oligonucleótidos antisentido para omisión del exón: el documento US-A-2003/0170704 de Stamm y col. se refiere a sustancias que son capaces de controlar la inclusión del exón 10 de MAPT (reguladores del corte y empalme proteico o su ADNc, polipéptidos que controlan la fosforilación de los reguladores de corte y empalme, o su ADNc y oligonucleótidos antisentido que interactúan con las uniones de corte y empalme del exón 10 de MAPT). Además, el trabajo de Kalbfuss y col.⁴ ha demostrado que los oligorribonucleótidos que se unen a las uniones de corte y empalme del exón 10 podrían suprimir la inclusión predominante del exón 10 en el ARNm de tau en el contexto de células PC12 de rata. Sin embargo, un trabajo reciente de Sud R y col.⁵ demostró que la selección del exón 10 con oligonucleótidos morfolino antisentido no producía omisión del exón en líneas celulares de neuroblastoma. Estos autores afirman que la regulación del corte y empalme del exón 10 en células que expresan predominantemente la isoforma 4R puede variar de la línea celular del neuroblastoma en la que domina la isoforma 3R.
- Trans-corte y empalme del exón 10: Se utilizó reprogramación de ARN mediante corte y empalme *in trans* de ARN mediado por espliceosomas (SMArt) para corregir el corte y empalme aberrante del exón 10 resultante de mutaciones de FTDP-17 en un sistema de minigén en células en cultivo⁶. Este abordaje, sin embargo, se ve afectado por la baja eficiencia.
- En el documento WO 2007/107789 se desvelan moléculas de ARNip dirigidas al exón 10 del gen MAPT para terapia de enfermedades neurodegenerativas.

Objeto y sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico eficaz en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas con anomalías de la proteína tau codificada por el gen MAPT.

Según la invención, el objeto anterior se logra gracias al procedimiento especificado en las reivindicaciones siguientes, que se entienden como parte integrante de la presente descripción.

En una realización, la presente divulgación desvela un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas con anomalías de la proteína tau codificada por el gen MAPT, en el que dicho agente terapéutico comprende uno o más ARNip dirigidos a la secuencia del exón 10 del gen MAPT (SEQ ID No.: 1), en el que uno o más ARNip se seleccionan de un ARN bicatenario compuesto por una cadena sentido que comprende una secuencia de bases descrita en una cualquiera de las SEQ ID No.: 2, 4, 6 y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un saliente en el terminal de la cadena sentido y/o cadena antisentido.

En otra realización adicional, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más ARNip, en la que uno o más ARNip comprenden una cadena sentido que comprende al menos 19 bases continuas de ARNm correspondientes a la secuencia del exón 10 de MAPT de la SEQ ID No.: 1 y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que los uno o más ARNip se seleccionan de entre un ARN bicatenario compuesto por una cadena sentido que comprende una secuencia de bases descrita en una cualquiera de las SEQ ID No.: 2, 4, 6 y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un saliente en el terminal de la cadena sentido y/o cadena antisentido.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se describirá a continuación, únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras de dibujo adjuntas, en las que:

- **Figura 1. Análisis de RT-PCR semicuantitativa de los niveles del exón 10 en células SH-SY5Y transfectadas con plásmido de tipo silvestre y mutante N279.** La electroforesis en gel muestra los productos de la RT-PCR de las transcripciones de los minigenes, que contienen el exón 10 (E10+, 290 pb) y sin exón 10 (E10-, 210 pb). El histograma representa las unidades densitométricas de cada condición de tratamiento normalizada en β actina. Los valores representan la media $\pm$ SD (n=3).
- **Figura 2. Imágenes representativas de la línea celular SH-SY5Y transfectadas con 0,25 mg de plásmido de tipo silvestre o plásmido mutante.** Plásmidos indicadores A) de tipo silvestre y B) Mutantes N279.
- **Figura 3. Establecimiento de valores de umbral basados en las intensidades de RFP y GFP.** Gráficos de dispersión que representan los valores verde/rojo (G/R) de cada célula en un pocillo en particular que lleva uno de los plásmidos indicadores dobles (SV y Mut, respectivamente). Los umbrales indicados se seleccionan arbitrariamente para clasificar la población celular en tres clases diferentes.
- **Figura 4. Análisis basado en imágenes de células SH-SY5Y transfectadas con plásmidos indicadores de tipo silvestre y mutantes.** El histograma representa las lecturas seleccionadas del análisis cuantitativo de los dos indicadores, tales como los porcentajes relativos de las tres subpoblaciones de células SH-SY5Y clasificadas por propiedades de intensidad, la eficacia de la transfección y la viabilidad celular. Los valores representan la media $\pm$ SD (n = 3)
- **Figura 5. Secuencias E10 de tau humana (mayúscula) y secuencias I9 e I10 flanqueantes (minúscula).** Los sitios de corte y empalme en 5' y 3' se indican mediante 5'ss y 3'ss, respectivamente. Solo se indican las mutaciones de FTDP-17 que afectan al corte y empalme de E10. Las delecciones se indican mediante triángulos sombreados. Se indican las secuencias y la posición diana de los tres ARNip diseñados.
- **Figura 6. Se ha realizado un ensayo de cribado basado en imágenes para los diferentes ARNip y se compararon con los valores obtenidos con un ARNip de control.** Los ARNip se cotransfectaron en células SH-SY5Y junto con 0,25 μ g de plásmido de minigén indicador mutante. Los valores representan la media $\pm$ SD (n = 3)
- **Figura 7. Se ha realizado un ensayo de cribado basado en imágenes para los diferentes ARNip y se ha comparado con los valores obtenidos con un ARNip de control.** Los ARNip se cotransfectaron en células SH-SY5Y junto con 0,5 μ g de plásmido de minigén indicador mutante. Los valores representan la media $\pm$ SD (n = 3).
- **Figura 8. Análisis de RT-PCR semicuantitativa de células SH-SY5Y transfectadas con el plásmido indicador del minigén y el ARNip A.**
- **Figura 9. Análisis de RT-PCR semicuantitativa de células SH-SY5Y transfectadas con el plásmido indicador del minigén y el ARNip B.**
- **Figura 10. Análisis de RT-PCR semicuantitativa de células SH-SY5Y transfectadas con el plásmido indicador del minigén y ARNip C.**
- **Figura 11. RT-PCR semicuantitativa de células NSC34 transfectadas con tres ARNip o un ARNip de control.**
- **Figura 12. Secuencia de nucleótidos del exón 10 de PFLARE 5A MAPT.**

- **Figura 13. Secuencia de nucleótidos del exón 10 de PFLARE 5A MAPT MUT.**

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá con mayor detalle a continuación, a modo de ejemplo no limitante, con referencia a una terapia mediada por ARN interferente que hace uso de un modelo celular que recapitula las condiciones patológicas de la demencia frontotemporal con parkinsonismo ligado al cromosoma 17 (FTDP-17). No obstante, la terapia mediada por ARN interferente desvelada en el presente documento puede usarse para el tratamiento de otras enfermedades neurodegenerativas asociadas con anomalías en la proteína tau codificada por el gen MAPT, como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la distrofia miotónica de tipo 1 y la enfermedad de Parkinson.

En la siguiente descripción, se dan numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de las realizaciones. Las realizaciones se pueden poner en práctica sin uno o más de los detalles específicos, o con otros procedimientos, componentes, materiales, etc. En otros casos, las estructuras, materiales u operaciones bien conocidos no se muestran ni describen con detalle para evitar enmascarar aspectos de las realizaciones.

La referencia a lo largo de la presente memoria descriptiva a "una realización" o "realización" significa que un rasgo estructura o característica particular descritos en relación con la realización se incluye en al menos una realización. Por tanto, las apariciones de las frases "en una realización" o "en una realización" en varios lugares a lo largo de la presente memoria descriptiva no se refieren todas necesariamente a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

Los encabezados proporcionados en el presente documento son solo con fines de comodidad y no interpretan el ámbito o significado de las realizaciones.

La presente descripción se refiere a un agente terapéutico para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas con anomalías de la proteína tau codificada por el gen MAPT, en el que dicho agente terapéutico comprende uno o más ARNip dirigidos al exón 10 del gen MAPT, en el que los uno o más ARNip se seleccionan de entre un ARN bicatenario compuesto por una cadena sentido que comprende una secuencia de bases descrita en una cualquiera de las SEQ ID No.: 2, 4, 6 y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un saliente en el terminal de la cadena sentido y/o cadena antisentido.

En todavía una realización adicional preferida, la presente descripción proporciona uno o más ARNip dirigidos al exón 10 del gen MAPT capaces de inducir la degradación selectiva de las transcripciones de MAPT que contienen el exón 10.

Las enfermedades neurodegenerativas asociadas a anomalías de la proteína tau codificada por el gen MAPT que se pueden beneficiar de la administración de uno o más ARNip dirigidos al exón 10 del gen MAPT se seleccionan de entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, distrofia miotónica de tipo 1, enfermedad de Parkinson, demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (FTDP-17).

La descripción desvela un procedimiento de tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada con anomalías de la proteína tau codificada por el gen MAPT que comprende administrar a un paciente que lo necesita uno o más ARNip dirigidos al exón 10 del gen MAPT, en el que el uno o más ARNip comprenden una cadena sentido que comprende al menos 19 bases continuas de ARNm correspondiente a la secuencia del exón 10 de MAPT de la SEC ID No.: 1 y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma en una cantidad suficiente para realizar dicho tratamiento, en el que uno o más ARNip inducen la degradación selectiva de las transcripciones de MAPT que contienen el exón 10, en el que los uno o más ARNip se seleccionan de entre un ARN bicatenario compuesto por una cadena sentido que comprende una secuencia de bases descrita en una cualquiera de las SEQ ID No.: 2, 4, 6 y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un saliente en el terminal de la cadena sentido y/o cadena antisentido.

En otra realización adicional, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende uno o más ARNip dirigidos al exón 10 del gen MAPT y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que los uno o más ARNip se seleccionan de entre un ARN bicatenario compuesto por una cadena sentido que comprende una secuencia de bases descrita en una cualquiera de las SEQ ID No.: 2, 4, 6 y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un saliente en el terminal de la cadena sentido y/o cadena antisentido.

La presente divulgación muestra la viabilidad de una terapia génica basada en ARNip para permitir el silenciamiento génico postranscripcional de las transcripciones de MAPT que contienen el exón 10 en FTDP-17. Se ha diseñado un panel de ARNip dirigidos al ARNm de tau que contiene el exón 10 y se ha probado en células SH-SY5Y en un plásmido indicador de minigén mutante en el contexto de la mutación de sentido erróneo N279 (AAT a AAG) que recapitula la enfermedad de FTDP-17. Además, los 3 ARNip se probaron en células NSC34 (una línea celular similar a una motoneurona)¹ para validar los efectos sobre la afección endógena con una inclusión predominante del exón

10 (80 %).

El efecto de los ARNip se ha analizado utilizando un sistema de imágenes de alto contenido. Los resultados obtenidos a través del ensayo de detección se han validado aún más mediante un análisis de RT-PCR. El efecto sobre las transcripciones de MAPT que contienen el exón 10 endógeno se ha probado mediante análisis de RT-PCR.

En la presente descripción, los inventores diseñaron un nuevo abordaje para la restauración de una relación 4Rtau/3Rtau normal, en función del uso de ARNip dirigidos al exón 10 de MAPT e inducen la degradación selectiva de las transcripciones de MAPT que contienen el exón 10. Estos ARNip proporcionan un beneficio terapéutico para los pacientes con FTDP-17 que portan mutaciones en el exón 10 de MAPT que provocan la inclusión del exón 10, ya que las secuencias diana no se ven afectadas por las mutaciones.

Los tres ARNip evaluados en el presente documento tienen las siguientes secuencias de nucleótidos:

ARNip A':

cadena sentido: 5'AGUCCAAGUGUGGCUCAAA3' - SEQ ID No.: 2,
cadena antisentido: 5'UUUGAGCCACACUUGGACU3' - SEQ ID No.: 3;

ARNip B':

cadena sentido: 5'GGCUCAAAGGAUAAUAUCA3' - SEQ ID No.: 4,
cadena antisentido: 5'UGAUAAUUAUCCUUUGAGCC3' - SEQ ID No.: 5;

ARNip C':

cadena sentido: 5'GCAACGUCCAGUCCAAGUG3' - SEQ ID No.: 6,
cadena antisentido: 5'CACUUGGACUGGACGUUGC3' - SEQ ID No.: 7.

De los 3 ARNip probados (A, B y C), el ARNip B muestra la máxima eficacia en la degradación de la transcripción. Estos resultados se han validado usando un minigén que recapitula la mutación de corte y empalme N279 y se exhibe un efecto similar en células NSC34^{7,8} (un híbrido de neuronas motoras de la médula espinal de ratón y la línea celular de neuroblastoma).

Una revisión reciente de Rettig y col.⁹ ha resumido los posibles abordajes de administración de las moléculas de ARNip y su éxito en los ensayos clínicos. El desarrollo actual en el campo y los estudios en curso establecen la importancia de estos ARNip sintéticos, que pueden servir como agentes terapéuticos potenciales tras una liberación y administración adecuadas.

La administración directa en el SNC (sistema nervioso central) se utiliza como procedimiento de elección en enfermedades neurodegenerativas debido a la entrada restringida a través de la barrera hematoencefálica. Las opciones de liberación incluyen inyección intratecal, intraventricular, inyección epidural e intratistular directa. Los procedimientos de administración incluyen infusiones a largo plazo o mediante el uso de mini bombas.

Se utilizaron bombas intraventriculares crónicas para la liberación de ARNip contra el gen de la proteína precursora amiloide (App) para estudiar las funciones relacionadas con la enfermedad de Alzheimer en ratones adultos. Mediante ARNip potentes se observaron disminuciones eficientes¹⁰.

Usando la liberación desnuda y sin ayuda de ARNip en solución salina tamponada, se realizó una infusión crónica en primates no humanos para suprimir los niveles de α sinuceína¹¹. Se sabe que esta proteína está asociada con la enfermedad de Parkinson. Se utilizaron minibombas osmóticas para la infusión directa en la sustancia negra, lo que condujo a una disminución de la α sinuceína tanto a nivel de ARNm como de proteína.

Se usaron ARNip con enlaces PS modificados y restos de 2'F-pirimidina cerca de los extremos de cada cadena¹² para infusión crónica en el SNC del modelo de ratón de SOD1 (G93A) de esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Se observó una reducción significativa del ARNm de SOD1 en la médula espinal. En el modelo de ratón transgénico, una infusión durante un período de 28 días permitió aliviar la progresión de la enfermedad. Los ARNip se mantuvieron estables durante el transcurso de este período.

Se utilizaron ARNip¹³ conjugados con colesterol para la inyección intraestriatal directa para apuntar al gen de Huntington mutante (Htt) en el contexto de la enfermedad de Huntington.

Las estrategias mencionadas anteriormente destacan los diferentes modos de liberación de ARNip y demuestran eficacia *in vivo*.

Materiales y procedimientos

ARNip

Los siguientes ARNip, empleados en los presentes experimentos, se diseñaron a lo largo del tramo del exón 10 (SEQ ID No.: 1) y fueron producidos por Eurofin Genomics, Ebersberg, Alemania.

ARNip A:

5 cadena sentido: 5'AGUCCAAGUGUGGCUCAAAdTdT3' - SEQ ID No.:19,
 cadena antisentido: 5'UUUGAGCCACACUUGGACUdTdT3' - SEQ ID No.:20;

ARNip B:

 cadena sentido: 5'GGCUCAAAGGAUAAUAUCAdTdT3' - SEQ ID No.:21,
 cadena antisentido: 5'UGAUAAUUAUCCUUUGAGCCdTdT3' - SEQ ID No.:22;

ARNip C:

10 cadena sentido: 5'GCAACGUCCAGUCCAAGUGdTdT3' - SEQ ID No.:23,
 cadena antisentido: 5'CACUUGGACUGGACGUUGCdTdT3' - SEQ ID No.:24;

ARNip de control:

 cadena sentido: 5' UAAUGUAUUGGAACGCAUAdTdT3' - SEQ ID No.:8,
 cadena antisentido: 5'UAUGCGUCCAUAUACAUAAdTdT3' - SEQ ID No.:9.

15 Las secuencias de ARNip anteriores difieren de la SEQ ID No.: 2 a 7 en la presencia de un saliente que consiste en dos monofosfato desoxirribosilimina (dT), que se introdujeron en las SEQ ID No.: 2 a 7 en el extremo 3' para aumentar la estabilidad intracelular del ARNip y su eficacia.

20 La Figura 5 muestra la secuencia de E10 de tau humana (mayúsculas, correspondiente a la SEQ ID No.: 1) y secuencias flanqueantes 19 e I10 (minúsculas); la secuencia de E10 de tau humana que comprende las secuencias flanqueantes de 19 (11 bases) y 110 (26 bases) se proporciona en la SEC ID No.: 18. Los sitios de corte y empalme en 5' y 3' se indican mediante 5'ss y 3'ss, respectivamente. Solo se indican las mutaciones de FTDP-17 que afectan al corte y empalme del exón 10. Las delecciones se indican mediante triángulos sombreados. Se proporcionan las secuencias y la posición objetivo de los tres ARNip diseñados, A B y C.

Línea celular SHYS5Y

25 La línea celular SH-SY5Y (patrones ATCC-LGC, Teddington, UK; # CRL-2266) utilizada para experimentos de transfección es una sublínea clonada tres veces (SK-N-SH -> SH-SY -> SH-SY5 -> SH-SY5Y) de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH con un contenido de 15 % del exón 10+ y 85 % del exón 10- en su transcripción. La eficiencia de la transfección (25 % a 30 %) en esta línea celular es comparativamente más alta que en las otras líneas celulares de neuroblastoma. Por lo tanto, esta línea celular se eligió para probar la eficacia de los ARNip
30 contra las transcripciones endógenas del exón 10+ y para las cotransfecciones de los ARNip con plásmidos indicadores del minigén.

Línea celular NSC-34

35 La línea celular híbrida de tipo motoneurona de ratón NSC-34 (Cellutions biosystems, Burlington, Ontario, Canadá; # CLU140-A) se produjo mediante fusión de células embrionarias de la médula espinal de ratón enriquecida en motoneuronas con neuroblastoma de ratón^{7,8}. Los cultivos contienen dos poblaciones de células: células indiferenciadas pequeñas que tienen la capacidad de experimentar división celular y células multinucleadas más grandes. Estas células expresan muchas propiedades de las neuronas motoras, incluyendo colina acetiltransferasa, síntesis de acetilcolina, proteínas de almacenamiento y liberación y triplete de neurofilamentos. Estas células se pueden diferenciar utilizando el ácido retinoico todo trans (atRA), estableciéndose así como un modelo adecuado
40 para el estudio *in vitro* de la fisiopatología en las neuronas motoras.

Mutagénesis del indicador fluorescente con el exón 10

45 El plásmido indicador fluorescente creado por Peter Stoilov y col.³, PFLARE 5A MAPT Exón 10 también denominado plásmido de tipo silvestre (WT) (SEQ ID No.: 10 - Figura 12), se mutó utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quick change II site XL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; n.º 200521) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los siguientes cebadores se diseñaron de manera que incorporaran el cambio de nucleótido de T a G.

 Cebador directo:
 5'CCAAAGGTGCAGATAATTAAGAAG3' - SEQ ID No.: 11
 Cebador inverso:
 5'GTTGCTAAGATCCAGCTTCTTCTT3' - SEQ ID No.: 12

50 El plásmido resultante PFLARE 5A MAPT MUT Exón 10 (SEQ ID No.: 13 - Figura 13) se denominará plásmido mutante N279 (Mut).

Tratamiento de ARNip en afección endógena

1. Transfección de células SHYS5Y y células NSC-34 con ARNip

La transfección de células SHYS5Y y células NSC34 con ARNip se realizó utilizando el reactivo de transfección a base de lípidos Lipofectamine 3000 (Life Technologies-Invitrogen, Monza, Italia; n.º L3000-008).

5 1.1. Preparación de las células

1.1.1) El día anterior al experimento, se sembraron 5×10^4 células en una placa de 24 pocillos en 500 µl de medio completo sin antibióticos a 37 °C en CO₂ al 5 %.

1.2. Transfección de ARNip

10 1.2.1) Las transfecciones se realizaron según las instrucciones del fabricante con 2 (µl) Lipofectamine 3000 para un intervalo de concentración de ARNip comenzando desde 10 nM a 100 nM, en medio Opti-MEM sin rojo fenol (Life Technologies-Gibco, Monza, Italia; # 11058-021) por pocillo en un volumen final de 500 µl.

1.2.2) Como controles, las células se trataron solo con Lipofectamine 3000 (Simulado) y se transfectaron con ARNip no dirigido (controles no específicos - SEQ ID No.: 8 y 9).

1.2.3) Después de la transfección, las células se incuban a 37 °C en CO₂ al 5 % durante 48 horas.

15 1.2.4) A continuación, los pocillos se lavaron con PBS (1X) y el reactivo Trizol (Life Technologies, Monza, Italia; # 15596-026) se utilizó para la extracción de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante para los análisis posteriores.

2. Co-transfección de plásmido indicador y ARNip en células SHYS5Y

2.1. Preparación de las células

20 1.1) El día anterior al experimento, se sembraron 5×10^4 células en una placa de 24 pocillos en 500 µl de medio completo (es decir, mezcla 1:1 de EMEM (Lonza # 12-125F) y MEZCLA DE NUTRIENTES F12 (Life Technologies-Gibco # 1765-054) con 10 % de suero bovino fetal (FBS)) sin antibióticos a 37 °C en CO₂ al 5 %. El formato de placa de 24 pocillos se ha elegido para permitir la recuperación de un número suficiente de células al final del ensayo después del análisis basado en imágenes, para realizar análisis moleculares posteriores, tales como RT-PCR y

25 transferencia Western.

2.2. Co-transfección basada en lípidos de ADN y ARNip

2.2.1) Las transfecciones se realizan según las instrucciones del fabricante con una relación de ADN (ng):Lipofectamine 3000 (µl) de 1:2 en medio Opti-MEM (GIBCO Lifetechnologies). Los plásmidos (SEQ ID No.: 10 y 13) se utilizan a una concentración de 0,25 µg y 0,5 µg por pocillo en un volumen final de 500 µl.

30 2.2.2) Dos indicadores plasmídicos diferentes (SEQ ID No.: 10, 13) se utilizan para la transfección, a saber, el plásmido de tipo silvestre (SV) (SEQ ID No.: 10) y el plásmido de tipo mutante (Mut) (SEQ ID No.: 13).

2.2.3) ARNip (SEQ ID No.: 19 a 24) se utilizan a las concentraciones de 10 nM a 100 nM en un volumen final de 500 µl por pocillo.

3. Adquisición y análisis de imágenes de alto contenido

35 Preparación de células para adquisición de imágenes

3.1) Las imágenes de las células transfectadas se capturaron con un sistema de imágenes de alto contenido (Operetta, Perkin Elmer). 48 horas después de la transfección, las células se incuban durante 20 minutos a 37 °C en presencia de 1 mg/ml de colorante fluorescente Hoechst 33342. Esto permite la contratinción de los núcleos, lo que permitirá los análisis posteriores.

40 Adquisición de imágenes

3.2) Las imágenes se tomaron con un objetivo LWD 20X (Perkin Elmer # HH12940107), en combinación con diferentes conjuntos de filtros: en particular un filtro para tinción Hoechst 3342 (filtro de excitación: 360-400 nm (Perkin Elmer n.º HH12000301); filtro de emisiones: 410-480 nm (Perkin Elmer # HH12000401)) se utiliza para obtener imágenes de los núcleos teñidos a un tiempo de exposición de 20 ms, mientras que se utiliza una combinación de filtros para medir las intensidades de los indicadores: GFP (filtro de excitación: 460-490 nm (Perkin Elmer HH1200030); filtro de emisión: 500-550 nm (Perkin Elmer # HH12000405)) y RFP (filtro de excitación: 520-550 nm (Perkin Elmer n.º HH12000305); filtro de emisiones: 560-630 nm (Perkin Elmer # HH12000410)), ambos a un tiempo de exposición de 200 ms.

Análisis de imagen

50 3.3) Para el protocolo de extracción de rasgos, las células se segmentaron y se analizaron utilizando el siguiente flujo de trabajo:

3.3.1) La primera etapa es la identificación de Núcleos, los principales objetos de interés que se segmentan mediante el uso del algoritmo más adecuado (phenoLOGIC™, PerkinElmer).

3.3.2) Suponiendo una distribución homogénea de GFP y RFP en las células, la región nuclear se seleccionó para cuantificar la intensidad media de fluorescencia en los dos canales.

3.3.3) La subpoblación de células transfectadas se identificó utilizando una estrategia de doble umbral para filtrar las células que eran positivas para G(GFP) o para R(RFP) o para ambos.

3.3.4) Restringir el análisis solo a las células transfectadas, la relación entre las propiedades de fluorescencia, la intensidad media de G y R se calcula por célula. G/R es un parámetro que indica la prevalencia de expresión de un indicador sobre el otro. Específicamente, una puntuación baja indica la inclusión del exón del casete, mientras que una alta está conectada con un corte y empalme eficiente del exón 10.

3.3.5) Se puede visualizar una descripción general de las propiedades numéricas de las células campo por campo en un diagrama de dispersión. Como alternativa, para obtener una representación más completa de todas las células dentro de un pocillo, se pueden crear gráficos de dispersión o histogramas de propiedades de una sola célula para pocillos representativos de las condiciones de los plásmidos SV y Mut. Estas representaciones gráficas permiten una selección más precisa de un umbral superior J y un umbral inferior K, distinguir para las células que expresan preferentemente GFP ($G/R > J$), RFP ($G/R < K$) o que expresan ambos indicadores por igual ($K < G/R < J$) (Fig. 1). Se usó el software de imagen de alto contenido Harmony^R (PerkinElmer).

3.4.6) A continuación, los umbrales se aplicaron en un módulo basado en filtros para clasificar las células en tres subpoblaciones diferentes. En síntesis, en función de las intensidades emitidas por las señales de fluorescencia, se midieron 3 lecturas como resultado de establecer valores de umbral específicos: células que expresan principalmente GFP ($G/R > J$), células que expresan principalmente RFP ($G/R < K$), células que expresan por igual ambos indicadores ($K < G/R < J$).

3.4.7) Las salidas de rasgos incluyen el recuento total de células, el recuento de células transfectadas y el % calculado sobre el número total de células, la mediana el valor de G/R de todas las células del pocillo, el % de células que expresan preferentemente GFP ($G/R > J$), RFP ($G/R < K$) y que expresan ambos indicadores por igual ($K < G/R < J$).

3.4.8) El porcentaje de viabilidad celular se calculó de la siguiente manera: (número total de células en el pocillo transfectado/número total de células en Simulado) * 100

4. Extracciones de ARN y RT-PCR

4.1) Los pocillos se lavaron con 1X PBS y se extrajo el ARN de cada pocillo usando el reactivo Trizol siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2) El ARN extraído se trató con ADNasa utilizando el kit Turbo DNase (Life Technologies-Ambion # AM1907) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.3) Se realizó transcripción inversa de 500 ng del ARN extraído a ADNc con el kit de síntesis de ADNc Revert Aid First Strand (Thermoscientific # K1622) utilizando oligonucleótidos oligo dT18 (un oligonucleótido sintético de una sola cadena de 18 unidades con extremos 5'- y 3'-hidroxilo, disponible en el kit), siguiendo el protocolo del fabricante.

4.4) El ADNc obtenido sirve como molde para reacciones de RT-PCR semicuantitativas para evaluar la expresión del exón 10 en estas transcripciones.

CICLO DE PCR:

10 min	95 °C
0:30 segundos	95 °C
0:40 segundos	60 °C
1 min	72 °C
10 min	72 °C
∞	4 °C

4.4) Los niveles de expresión de las transcripciones que contienen el exón 10 se analizan con los siguientes cebadores:

Afección endógena:

TAUR9F: 5'CTGAAGCACCACCAGCCGGGAGG3' - SEQ ID No.: 14,
TAU13R: 5'TGGTCTGTCTTGGCTTTGGC3' - SEQ ID No.: 15.

Indicadores plasmídicos:

Exón 1 Bgl para: 5'AAACAGATCTACCATTGGTGCACCTGACTCC3' - SEQ ID No.: 16,
EGFP Inv: 5'CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG3' - SEQ ID No.: 17.

4.5) Los productos amplificados se dejan correr con una escalera de ADN de 100 pb (Fermentas) en una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (bromuro de etidio al 5 %) a 100 voltios en tampón de carrera TBE 1X durante 40 minutos.

4.6) Los análisis densitométricos se realizan con el software Image J (un sistema de arquitectura abierta que utiliza

el complemento Java) después de la adquisición de imágenes con el sistema de imágenes BioDoc-It (UPV, Upland, CA, EE. UU.).

Resultados

Se analizó la eficacia de los ARNip en los minigenes indicadores transfectados. El trabajo anterior de Stoilov P y col.³ ha demostrado que el corte y empalme de un plásmido indicador fluorescente de dos colores (verde/rojo) con el exón 10 de MAPT se puede modular utilizando compuestos bioactivos. El plásmido indicador (SEQ ID No.: 10) se produjo de manera tal que la inclusión del exón 10 favorezca la producción de RFP (proteína roja fluorescente) y la exclusión del exón 10 produzca GFP (proteína verde fluorescente) (Fig. 1). Se usó el plásmido indicador creado por Stoilov y col. y denominado indicador de tipo silvestre (ya que recapitulaba la afección endógena del contenido del exón 10 en la mayoría de las líneas celulares de neuroblastoma) (Fig. 1). El plásmido se mutó aún más para incorporar la mutación N279 para alterar el corte y empalme (AAT a AAG), recapitulando la afección patológica FTDP-17 (SEQ ID No.: 13). Este cambio de base crea un tramo rico en purinas (AAGAAGAAG) y se asemeja a un consenso de potenciador del corte y empalme del exón; esto altera el corte y empalme que conduce a la inclusión del exón 10 y la posterior producción de RFP (Fig. 1).

Con el fin de analizar los efectos de los ARNip sobre los minigenes indicadores, los presentes inventores desarrolló un análisis basado en imágenes para cuantificar los indicadores fluorescentes, obteniendo lecturas basadas en una sola célula utilizando un sistema de cribado de alto contenido. En resumen, la línea celular SH-SY5Y se transfectó con plásmido de tipo silvestre o plásmido mutante. Los dos plásmidos aseguran diferentes porcentajes de inclusión del exón 10 en la transcripción sometida a corte y empalme, lo que es evidente por la diferencia en el número de células rojas o verdes, y en su intensidad (Fig. 2). La intensidad de la fluorescencia verde y roja en las células transfectadas se midió con un instrumento Operetta High Content Screening y las células se agruparon en tres categorías: células rojas en las que la mayoría de las transcripciones lleva el exón 10, células verdes en las que la mayoría de las transcripciones carece del exón 10 y células amarillas en las que la proporción de las dos isoformas de corte y empalme es de alrededor de 1:1 (Fig. 3). Mediante este análisis, la mutación puntual en el minigén indicador (SEQ ID No.: 13) se evaluó para cambiar el corte y empalme del exón 10, alterando de este modo las señales fluorescentes desde un nivel relativamente bajo de RFP (2 %) a un nivel muy alto (65 %) debido a la inclusión del exón 10 (Fig. 3 y Fig. 4). La eficacia de la transfección fue de aproximadamente el 20 % y la viabilidad celular de aproximadamente el 60 % (Fig. 4).

Se han diseñado tres ARNip diferentes dirigidos al exón 10 (SEQ ID Nos 19 a 24) que abarcan la secuencia del exón 10, sobre la base de las siguientes reglas: se evitaron los tramos de 4 o más bases (tales como AAAA o CCCC), las regiones con un contenido de GC <30 % o > 60 %, las repeticiones y las secuencias de baja complejidad, los sitios de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP); se realizó una búsqueda de homología BLAST para evitar efectos fuera del objetivo en otros genes o secuencias (Fig. 5).

La eficacia de los tres ARNip diseñados se analizó a concentraciones crecientes tras su cotransfección con 0,5 µg (Fig. 6) o 0,25 µg el minigén indicador mutante (Fig. 7). En ambos diseños experimentales, el ARNip A (SEQ ID No.: 19 y 20), el ARNip B (SEQ ID No.: 21 y 22) y el ARNip C (SEQ ID No.: 23 y 24) fueron eficaces en la reducción de las transcripciones que contenían el exón 10. El ARNip B (SEQ ID No.: 21 y 22) parecía ser el ARNip más eficiente, disminuyendo las células rojas del 60 % al 15 % y aumentando las células amarillas del 40 % al 80 % (Fig. 7). El análisis de RT-PCR semicuantitativa confirmó la reducción del exón 10 tras el tratamiento con ARNip A (SEQ ID No.: 19 y 20, Fig. 8), ARNip B (SEQ ID No.: 20 y 22, Fig. 9) y ARNip C (SEQ ID No.: 23 y 24, Fig. 10) alcanzando una reducción del 10 %, 25 % y 20 %, respectivamente, tras el tratamiento con una concentración de 50 nM.

El efecto del ARNip A (SEQ ID No.: 19 y 20), el ARNip B (SEQ ID No.: 20 y 22) y el ARNip C (SEQ ID No.: 23 y 24) sobre la transcripción de MAPT endógena tras su transfección en la línea celular NSC34 (Fig. 11). En las células NSC34, el 83 % de la transcripción de MAPT endógeno contiene el exón 10 y el 17 % restante carece del exón 10, lo que sirve como un modelo adecuado para el estudio de los efectos del ARNip sobre las transcripciones que contienen el exón 10 en afecciones endógenas (Fig. 11). El análisis de RT-PCR muestra una reducción de las transcripciones endógenas del Exón 10+ tras el tratamiento con ARNip A (SEQ ID No.: 19 y 20) (6 %), B (SEQ ID No.: 20 y 22) (28 %) y C (SEQ ID No.: 23 y 24) (12 %) a una concentración de 50 nM. En este sistema modelo, por lo tanto, el ARNip B parece ser el ARNip más eficaz en la degradación selectiva de las transcripciones que contienen el exón 10.

REFERENCIAS

1. Miller y col. Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucl Acids Res* (2004) 32(2): 661-668
2. Xu y col. Tau Silencing by siRNA in the P301S Mouse model of Tauopathy. *Curr Gene Ther* (2014); 14 (5):343-351.
3. Stoilov y col. A high-throughput screening strategy identifies cardiotonic steroids as alternative splicing modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105(32): 11218-23.
4. Kalbfuss y col. Correction of alternative splicing of tau in frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *J Biol Chem* (2001) 276: 42986-42993.

5. Sud y col. Antisense-mediated Exon Skipping Decreases Tau Protein Expression: A Potential Therapy For Tauopathies. *Mol Ther Nucleic Acids* (2014) Jul 29; 3: e180
6. Rodriguez-Martin y col. Correction of tau mis-splicing caused by FTDP-17 MAPT mutations by spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Hum Mol Genet* (2009) 18(17): 3266-73.
7. Cashman y col. Neuroblastoma x spinal cord (NSC) hybrid cell lines resemble developing motor neurons. *Dev Dyn* (1992); 194 (3):209-21.
8. Maier y col. Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration. *Neurochem Int* (2013) 62(8): 1029-38
9. Rettig GR, Behlke MA Progress toward *in vivo* use of siRNAs-II *Mol Ther.* (2012) Mar;20(3):483-512.
10. Senechal y col. (2007). Amyloid precursor protein knockdown by siRNA impairs spontaneous alternation in adult mice. *J Neurochem* 102: 1928-1940.
11. McCormack y col. (2010). Alpha-synuclein suppression by targeted small interfering RNA in the primate substantia nigra. *PLoS ONE* 5: e12122.
12. Wang y col. (2008). Therapeutic gene silencing delivered by a chemically modified small interfering RNA against mutant SOD1 slows amyotrophic lateral sclerosis progression. *J Biol Chem* 283: 15845-15852.
13. DiFiglia y col. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) 104: 17204-17209.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> Università degli Studi di Trento	
20	<120> Terapia mediada por ARN interferente para enfermedades neurodegenerativas	
	<130> BWO18156-CF	
	<160> 24	
	<170> PatentIn versión 3.5	
25	<210> 1	
	<211> 93	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 1	
	gtgcagataa ttaataagaa gctggatctt agcaacgtcc agtccaagtg tggctcaaag	60
	gataatatca aacacgtccc gggaggcggc agt	93
30	<210> 2	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
35	<220>	
	<223> ARNip A'- cadena sentido	
	<400> 2	
	aguccaagug uggcucaa	19
40	<210> 3	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> ARNip A' - cadena antisentido	
45	<400> 3	
	uuugagccac acuuggacu	19
50	<210> 4	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	

	<223> ARNip B'- cadena sentido	
	<400> 4	
	ggcucaaagg auaauauca	19
5	<210> 5	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> ARNip B'- cadena antisentido	
10	<400> 5	
	ugauauuauuc cuuugagcc	19
	<210> 6	
	<211> 19	
15	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> ARNip C'- cadena sentido	
	<400> 6	
	gcaacgucca guccaagug	19
20	<210> 7	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
25	<223> ARNip C'- cadena antisentido	
	<400> 7	
	cacuuggacu ggacguugc	19
	<210> 8	
30	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> ARNip de control- cadena sentido	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (20)..(21)	
	<223> n significa desoxirribosiltimina (dT)	
	<400> 8	
	uaauguauug gaacgcauan n	21
40	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> ARNip - cadena antisentido	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (20)..(21)	
	<223> n significa desoxirribosiltimina (dT)	
50	<400> 9	
	uaugcguucc aauacauuan n	21

<210> 10
<211> 5948
<212> ADN
<213> artificial

5

<220>
<223> PLÁSMIDO PFLARE SV

<400> 10

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cgggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt	540
acgggtggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagcgcta	600
ccggactcag atctaccatt ggtgcacctg actcctgagg agaagtctgc cgttactgcc	660
ctgtggggca aggtgaacgt ggaagagttg gtggtgaggc cctgggccac cagtaagtat	720
caaggttaca agacaggttt aaggagacca atagaaactg ggcatgtgga gacagagaag	780
actcttgggt ttctgaattc ctcatccttt tttctggcta ccaaagggtgc agataattaa	840
taagaagctg gatccttagca acgtccagtc caagtgtggc tcaaaggata atatcaaaca	900
cgtcccggga ggcggcagtg tgagtacctt cacacgtccc atgcgccgtg ctgtggcttg	960
aattattagg aagtgggtgtg agtgcgta ca ttgcgagac actgcataga ataaatcctt	1020
ctggatccac catggtggct tagatccggg catgtggaga cagagaagac tgttgagttt	1080
gtgataagca ctgactctct ctgcctattg gtctattttc cctccctcag tggcggtcga	1140
ggacaaactc tacgcggact tgccagtagc cttcgtgagc aagggcgagg agctgttcac	1200
cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt	1260
gtccggcgag ggcgagggcg acgccacct cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac	1320
caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accctgacct acggcggtgca	1380
gtgcttttagc cgctaccccg accacctgaa gcagcacgac ttcttcaaga gtgcaatgcc	1440
cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagacccg	1500

ES 2 820 713 T3

cgccgaggtg	aagttcgagg	gcgacaccct	ggtgaaccgc	atcgagctga	agggcatcga	1560
cttcaaggag	gacggcaaca	tcctggggca	caagctggag	tacaactaca	acagccacaa	1620
cgtctatatc	accgccgaca	agcagaagaa	cggcatacaag	gtgaacttca	agatccgcc	1680
caacatcgag	gacggcagcg	tgcagctcgc	cgaccactac	cagcagaaca	ccccatcgg	1740
cgacggcccc	gtgctgctgc	ccgacaacca	ctacctgagc	acccagtccg	ccctgagcaa	1800
agaccccaac	gagaagcgcg	atcatatggt	cctgctggag	ttcgtgaccg	ccgccgggat	1860
cactctcggc	accgacgagc	tgtacaagta	accggtcgcc	accatggtga	gcaagggcga	1920
ggagaataac	atggccatca	tcaaggagtt	catgcgcttc	aaggtgcgca	tggagggctc	1980
cgtgaacggc	cacgagttcg	agatcgaggg	cgagggcgag	ggccgcccct	acgagggcac	2040
ccagaccgcc	aagctgaagg	tgaccaaggg	tggccccctg	cccttcgcct	gggacatcct	2100
aacccccaac	ttcacctacg	gtccaaggc	ctacgtgaag	caccccgccg	acatccccga	2160
ctacttgaag	ctgtccttcc	ccgagggctt	caagtgggag	cgcgtgatga	acttcgagga	2220
cggcggcgtg	gtgaccgtga	cccaggactc	ctccctgcag	gacggcgagt	tcatctacaa	2280
ggtgaagctg	cgcggcacca	acttcccctc	cgacggcccc	gtaatgcaga	agaagaccat	2340
gggctgggag	gcctcctccg	agcggatgta	ccccgaggac	ggcgccctga	agggcgagat	2400
caagatgagg	ctgaagctga	aggacggcgg	ccactacgac	gctgaggtca	agaccaccta	2460
caaggccaag	aagcccgtgc	agctgcccgg	cgctacatc	gtcggcatca	agttggacat	2520
cacctccac	aacgaggact	acaccatcgt	ggaactgtac	gaacgcgccg	agggccgcc	2580
ctccaccggc	ggcatggacg	agctgtataa	gtaagcggcc	gcgactctag	atcataatca	2640
gccataccac	atgtgtagag	gttttacttg	ctttaaaaaa	cctccacac	ctccccctga	2700
acctgaaaca	taaaatgaat	gcaattgttg	ttgttaactt	gtttattgca	gcttataatg	2760
gttacaata	aagcaatagc	atcaciaaatt	tcaciaataa	agcatttttt	tactgcatt	2820
ctagtgtg	tttgtccaaa	ctcatcaatg	tatcttaagg	cgtaaattgt	aagcgtaaat	2880
attttgtaa	aattcgcgtt	aaatttttgt	taaatcagct	cattttttta	ccaataggcc	2940
gaaatcggca	aaatccctta	taaatcaaaa	gaatagaccg	agataggggt	gagtgttggt	3000
ccagtttgga	acaagagtcc	actattaaag	aacgtggact	ccaacgtcaa	agggcgaaaa	3060
accgtctatc	agggcgatgg	cccactacgt	gaaccatcac	cctaatacaag	ttttttgggg	3120
tcgaggtgcc	gtaaagcact	aaatcggaac	cctaaaggga	gccccgatt	tagagcttga	3180
cggggaaaagc	cggcgaacgt	ggcgagaaaag	gaagggaaga	aagcgaaagg	agcgggcgct	3240
agggcgctgg	caagtgtagc	ggtcacgctg	cgcgtaacca	ccacaccgcg	cgcgcttaat	3300
gcgccgctac	agggcgcgctc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aaccctatt	3360

ES 2 820 713 T3

tgtttat	tttt	tctaaataca	ttcaaata	tgtatccgctca	tgagacaata	accctgataa	3420
atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	cctgaggcgg	aaagaaccag	ctgtggaatg		3480
tgtgtcagtt	aggggtgtgga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	atgcaaagca		3540
tgcatctcaa	ttagtcagca	accaggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccc	gcaggcagaa		3600
gtatgcaaag	catgcattct	aattagtcag	caaccatagt	cccgccccta	actccgccc		3660
tcccccccct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgccc	ccatggctga	ctaatttttt		3720
ttatttatgc	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	tagtgaggag		3780
gcttttttgg	aggcctaggc	ttttgcaaag	atcgatcaag	agacaggatg	aggatcgttt		3840
cgcatgattg	aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggt	ggagaggcta		3900
ttcggctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgccgccgt	gttccggctg		3960
tcagcgcagg	ggcgcccggg	tctttttgtc	aagaccgacc	tgtccgggtg	cctgaatgaa		4020
ctgcaagacg	aggcagcggc	gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcgttcc	ttgcgcagct		4080
gtgctcgacg	ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgccgggg		4140
caggatctcc	tgtcatctca	ccttgctcct	gccgagaaag	tatccatcat	ggctgatgca		4200
atgcggcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgccc	atcgaccacca	agcgaacat		4260
cgcacgagc	gagcacgtac	tcggatggaa	gccggctctg	tcgatcagga	tgatctggac		4320
gaagagcatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	ggctcaaggc	gagcatgccc		4380
gacggcgagg	atctcgtcgt	gacccatggc	gatgcctgct	tgccgaatat	catggtggaa		4440
aatggccgct	tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	ccgctatcag		4500
gacatagcgt	tggtacccg	tgatattgct	gaagagcttg	gcggcggaatg	ggctgaccgc		4560
ttcctcgtgc	tttacgggat	cgcgcctccc	gattcgcagc	gcacgcctt	ctatcgctt		4620
cttgacgagt	tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	gcgacgccc		4680
acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	ggcttcggaa		4740
tcgttttccg	ggacgcccgc	tggtatgatc	tccagcgcgg	ggatctcatg	ctggagttct		4800
tcgcccaccc	tagggggagg	ctaactgaaa	cacggaagga	gacaataaccg	gaaggaaccc		4860
gcgctatgac	ggcaataaaa	agacagaata	aaacgcacgg	tggtgggtcg	ttgttcata		4920
aacgcggggg	tcggtcccag	ggctggcact	ctgtcgatac	cccaccgaga	ccccattggg		4980
gccaatacgc	ccgcgtttct	tctttttccc	cacccacccc	cccaagtctg	ggtgaaggcc		5040
cagggctcgc	agccaacgtc	ggggcggcag	gccctgccat	agcctcaggt	tactcatata		5100
tacttttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	aatttaaaag	gatctaggtg	aagatccttt		5160
ttgataatct	catgacaaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc		5220
ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct		5280

ES 2 820 713 T3

	tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa	5340
	ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag	5400
	tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc	5460
	tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg	5520
	actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca	5580
	cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat	5640
	gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg	5700
	tccgaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat ctttatagtc	5760
	ctgtcggggtt tccccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc	5820
	ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc ttttgctggc	5880
	cttttgcctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg	5940
	ccatgcat	5948
	<210> 11	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo - por producción de PFLARE 5A MUT Exón 10	
	<400> 11	
	ccaaaggtgc agataattaa gaag	24
10	<210> 12	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
15	<223> Cebador inverso - por producción de PFLARE 5A MUT Exón 10	
	<400> 12	
	gttgctaaga tccagcttct tctt	24
	<210> 13	
20	<211> 5940	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> PLÁSMIDO PFLARE MUT	
	<400> 13	
	tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
25	cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120

ES 2 820 713 T3

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgcccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccaccccc ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagcgcta	600
ccggactcag atctaccatt ggtgcacctg actcctgagg agaagtctgc cgttactgcc	660
ctgtggggca aggtgaacgt ggaagagttg gtggtgaggc cctgggccac cagtaagtat	720
caaggttaca agacaggttt aaggagacca atagaaactg ggcatgtgga gacagagaag	780
actcttgggt ttctgaattc ctcatccttt tttctggcta ccaaagggtgc agataattaa	840
gaagaagctg gatcttagca acgtccagtc caagtgtggc tcaaaggata atatcaaaca	900
cgtcccgga ggcggcagtg tgagtacctt cacacgtccc atgcgccgtg ctgtggcctt	960
aattattagg aagtgggtg agtgcgta cttgcgagac actgcataga ataaatcctt	1020
ctggatccac catggtggct tagatccggg catgtggaga cagagaagac tgttgagttt	1080
gtgataagca ctgactctct ctgcctattg gtctattttc cctccctcag tggcggtcga	1140
ggacaaactc tacgcggact tgccagtagc cttcgtgagc aagggcgagg agctgttcac	1200
cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt	1260
gtccggcgag ggcgagggcg acgccacct cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac	1320
caccggcaag ctgcccgtgc cctggccccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca	1380
gtgcttttagc cgctaccccg accacctgaa gcagcacgac ttcttcaaga gtgcaatgcc	1440
cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagaccg	1500
cgccgaggtg aagttcgagg gcgacacct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga	1560
cttcaaggag gacggcaaca tcctggggga caagctggag tacaactaca acagccacaa	1620
cgtctatatc accgccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca	1680
caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg	1740
cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc acccagtcg ccctgagcaa	1800
agaccccaac gagaagcgcg atcatatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat	1860
cactctcggc accgacgagc tgtacaagta accggtcgcc accatggtga gcaagggcga	1920
ggagaataac atggccatca tcaaggagtt catgcgcttc aaggtgcgca tggagggctc	1980
cgtgaacggc cacgagttcg agatcgaggg cgagggcgag ggccgcccct acgagggcac	2040

ES 2 820 713 T3

ccagaccgcc	aagctgaag	tgaccaagg	tgccccctg	cccttcgcct	gggacatcct	2100
aacccccaac	ttcacctacg	gctccaagg	ctacgtgaag	caccccgccg	acatccccga	2160
ctacttgaag	ctgtccttcc	ccgagggtt	caagtgggag	cgcgatga	acttcgagga	2220
cgccggcggtg	gtgaccgtga	cccaggactc	ctccctgcag	gacggcgagt	tcatctacaa	2280
ggtgaagctg	cgccggacca	acttccccctc	cgacggcccc	gtaatgcaga	agaagaccat	2340
gggctgggag	gcctcctccg	agcggtatga	ccccgaggac	ggcgccctga	aggcgagat	2400
caagatgagg	ctgaagctga	aggacggcgg	ccactacgac	gctgaggtca	agaccaccta	2460
caaggccaag	aagcccgtgc	agctgccccg	cgctacatc	gtcgcatca	agttggacat	2520
cacctccac	aacgaggact	acaccatcgt	ggaactgtac	gaacgcgccg	agggccgcca	2580
ctccaccggc	ggcatggacg	agctgtataa	gtaagcggcc	gcgactctag	atcataatca	2640
gccataccac	attttagtag	gttttacttg	ctttaaaaa	cctccacac	ctccccctga	2700
acctgaaaca	taaaatgaat	gcaattgttg	ttgttaactt	gtttattgca	gcttataatg	2760
gttacaata	aagcaatagc	atcacaaatt	tcacaaataa	agcatttttt	tactgcatt	2820
ctagttgtgg	tttgtccaaa	ctcatcaatg	tatcttaagg	cgtaaattgt	aagcgtaat	2880
attttggtta	aattcgcgtt	aaatttttgt	taaatcagct	cattttttta	ccaataggcc	2940
gaaatcgga	aatccctta	taaatcaaaa	gaatagaccg	agatagggtt	gagtgttgtt	3000
ccagtttgga	acaagagtcc	actattaaag	aacgtggact	ccaacgtcaa	aggcgaaaa	3060
accgtctatc	aggcgatgg	cccactacgt	gaaccatcac	cctaatacag	ttttttgggg	3120
tcgaggtgcc	gtaaagcact	aaatcggaac	cctaaaggga	gcccccgatt	tagagcttga	3180
cggggaaagc	cgcgaaacgt	ggcgagaaag	gaagggaaga	aagcgaaagg	agcgggcgct	3240
aggcgctgg	caagtgtagc	ggtcacgctg	cgcgtaacca	ccacaccgc	cgcgcttaat	3300
gcgccgctac	aggcgcgctc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aaccctatt	3360
tgtttatttt	tctaaataca	ttcaaataatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	3420
atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	cctgaggcgg	aaagaaccag	ctgtggaatg	3480
tgtgtcagtt	agggtgtgga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	atgcaaagca	3540
tgcatctcaa	ttagtcagca	accaggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccca	gcaggcagaa	3600
gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	cccgccccta	actccgcca	3660
tcccgccct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	ctaatttttt	3720
ttatttatgc	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	tagtgaggag	3780
gcttttttgg	aggcctaggc	ttttgcaaag	atcgatcaag	agacaggatg	aggatcgttt	3840
cgcatgattg	aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggt	ggagaggcta	3900

ES 2 820 713 T3

ttcggctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgccgccgt	gttccggctg	3960
tcagcgcagg	ggcgcccggg	tctttttgtc	aagaccgacc	tgtccgggtg	cctgaatgaa	4020
ctgcaagacg	aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcgttcc	ttgcgcagct	4080
gtgctcgacg	ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgccgggg	4140
caggatctcc	tgtcatctca	ccttgctcct	gccgagaaag	tatccatcat	ggctgatgca	4200
atggcgcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgcccac	tcgaccacca	agcgaaacat	4260
cgcacgcagc	gagcacgtac	tcggatggaa	gccggtcttg	tcgatcagga	tgatctggac	4320
gaagagcatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	ggctcaaggc	gagcatgccc	4380
gacggcgagg	atctcgtcgt	gacccatggc	gatgcctgct	tgccgaatat	catggtggaa	4440
aatggccgct	tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	ccgctatcag	4500
gacatagcgt	tggctaccog	tgatattgct	gaagagcttg	gcggcgaaat	ggctgaccgc	4560
ttcctcgtgc	tttacggtat	cgcgcctccc	gattcgcagc	gcacgcctt	ctatcgcctt	4620
cttgacgagt	tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	gcgacgccc	4680
acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	ggcttcggaa	4740
tcgttttccg	ggacgccggc	tggtatgatc	tccagcgcg	ggatctcatg	ctggagttct	4800
tcgcccaccc	tagggggagg	ctaactgaaa	cacggaagga	gacaataacc	gaaggaaccc	4860
gcgctatgac	ggcaataaaa	agacagaata	aaacgcacgg	tgttggtcgc	tttgttcata	4920
aacgcggggg	tcggtcccag	ggctggcact	ctgtcgatac	cccaccgaga	ccccattggg	4980
gccaatacgc	ccgcgtttct	tccttttccc	cacccacccc	ccaagtctgc	ggtgaaggcc	5040
cagggctcgc	agccaacgtc	ggggcggcag	gccctgccat	agcctcaggt	tactcatata	5100
tacttttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	aatttaaaag	gatctaggtg	aagatccttt	5160
ttgataatct	catgacaaaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	5220
ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	5280
tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	gagctaccaa	5340
ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	5400
tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	5460
tgctaatacct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	5520
actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	5580
cacagcccag	cttgagcgga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	5640
gagaaagcgc	cacgcttccc	gaaggagaaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	5700
tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgcctggtat	ctttatagtc	5760
ctgtcggggt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	5820

ES 2 820 713 T3

	ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc	5880
	ccttttgctca catgtttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg	5940
5	<210> 14 <211> 23 <212> ADN <213> artificial <220> <223> TAUR9F <400> 14 ctgaagcacc accagccggg agg	23
10	<210> 15 <211> 20 <212> ADN <213> artificial <220> <223> TAU13R <400> 15 tggctgtct tggcttggc	20
20	<210> 16 <211> 31 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Indicador plasmídico - Exón 1 Bgl para <400> 16 aaacagatct accattggtg cacctgactc c	31
25	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> artificial <220> <223> Indicador plasmídico- EGFP Inv <400> 17 cgtcgccgct cagctcgacc ag	22
30	<210> 18 <211> 130 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 18 ggctaccaaa ggtgcagata attaataaga agctggatct tagcaacgctc cagtccaagt	60
35	gtggctcaaa ggataatatc aaacacgtcc cgggaggcgg cagtgtgagt accttcacac	120
	gtcccatgcg	130
40	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> artificial <220>	

<223> ARNip A - cadena sentido con saliente
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 5 <223> n significa desoxirribosiltimina (dT)
 <400> 19
 aguccaagug uggcucaaan n 21
 <210> 20
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip A - cadena antisentido con saliente
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n significa desoxirribosiltimina (dT)
 <400> 20
 uuugagccac acuuggacun n 21
 20 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> ARNip B - cadena sentido con saliente
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)
 <223> n significa desoxirribosiltimina (dT)
 30 <400> 21
 ggcucaaagg auaauaucan n 21
 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip B - cadena antisentido con saliente
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (20)..(21)
 <223> n significa desoxirribosiltimina (dT)
 <400> 22
 ugauauuauuc cuuugagccn n 21
 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> ARNip C - cadena sentido con saliente
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(21)

	<223> n significa desoxirribosiltimina (dT)	
	<400> 23	
	gcaacgucca guccaagugn n	21
5	<210> 24	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> ARNip C - cadena antisentido con saliente	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (20)..(21)	
	<223> n significa desoxirribosiltimina (dT)	
15	<400> 24	
	cacuuggacu ggacguugcn n	21

REIVINDICACIONES

1. Agente terapéutico para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas con anomalías de la proteína tau codificada por el gen MAPT, en el que dicho agente terapéutico comprende uno o más ARNip dirigidos al exón 10 del gen MAPT, en el que los uno o más ARNip se seleccionan de entre un ARN bicatenario compuesto por una cadena sentido que comprende una secuencia de bases establecida en las SEQ ID No.: 2, 4 o 6, y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un saliente en el terminal de la cadena sentido y/o cadena antisentido.
2. Agente terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los uno o más ARNip inducen la degradación selectiva de las transcripciones de MAPT que contienen el exón 10.
3. Agente terapéutico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que las enfermedades neurodegenerativas asociadas con anomalías de la proteína tau codificada por el gen MAPT se seleccionan de entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, distrofia miotónica de tipo 1, enfermedad de Parkinson y demencia frontotemporal con parkinsonismo ligada al cromosoma 17 (FTDP-17).
4. Una composición farmacéutica que comprende uno o más ARNip, en la que los uno o más ARNip comprenden una cadena sentido que comprende al menos 19 bases continuas de ARNm correspondientes a la secuencia del exón 10 de MAPT establecida en la SEQ ID No.: 1 y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que los uno o más ARNip se seleccionan de entre un ARN bicatenario compuesto por una cadena sentido que comprende una secuencia de bases establecida en las SEQ ID No.: 2, 4 o 6, y una cadena antisentido que comprende una secuencia complementaria a la misma, que opcionalmente tiene un saliente en el terminal de la cadena sentido y/o cadena antisentido.

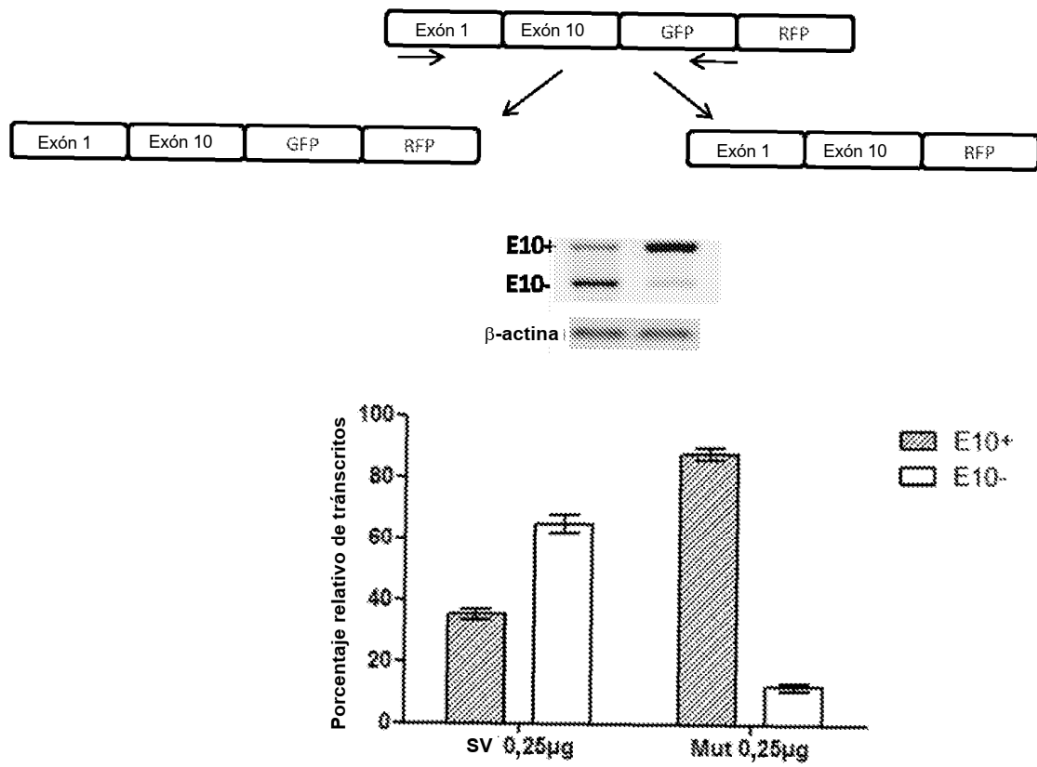


Figura 1

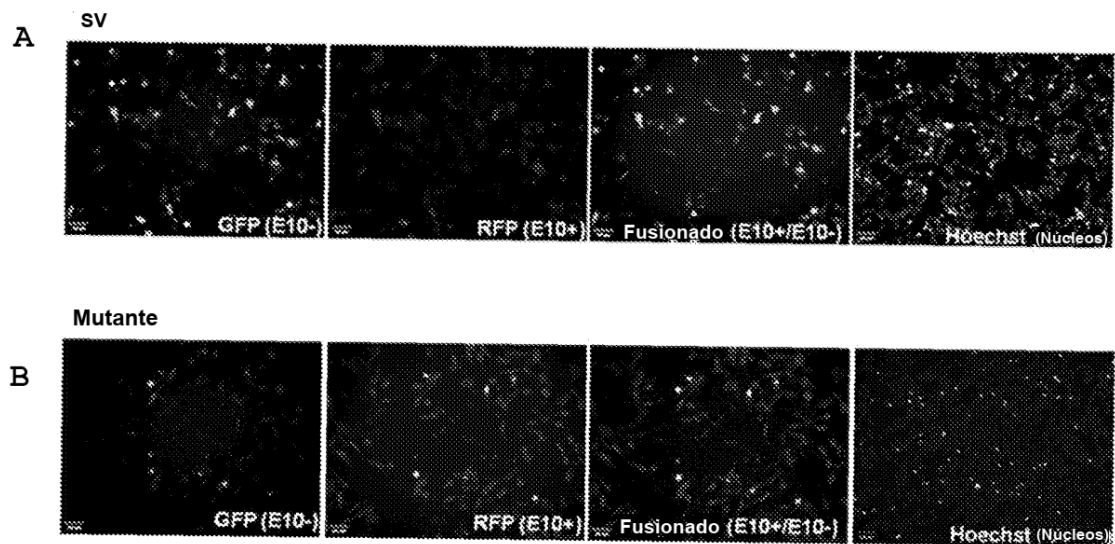


Figura 2

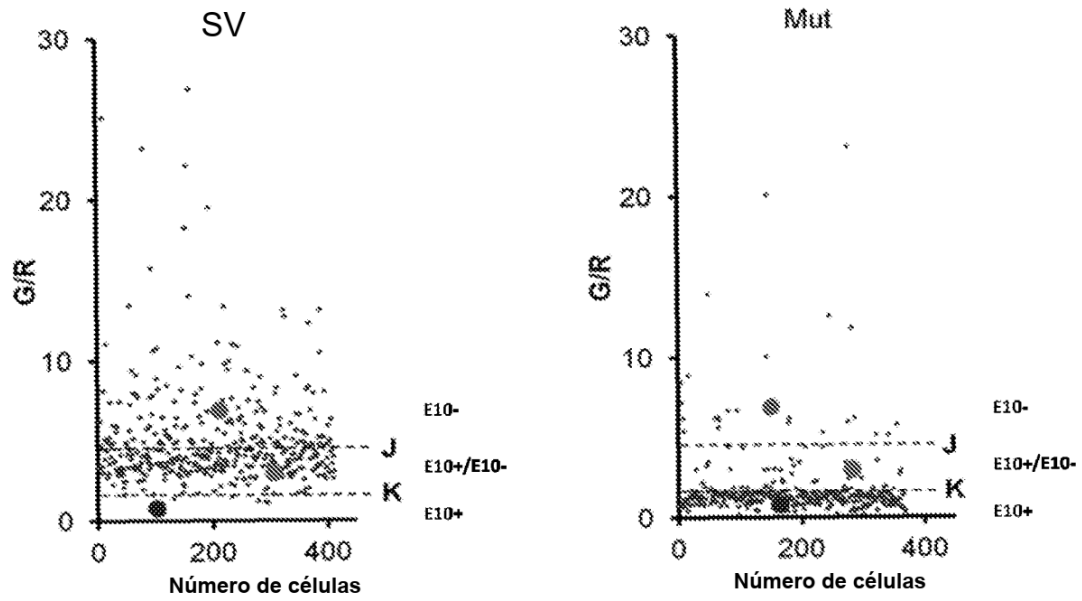


Figura 3

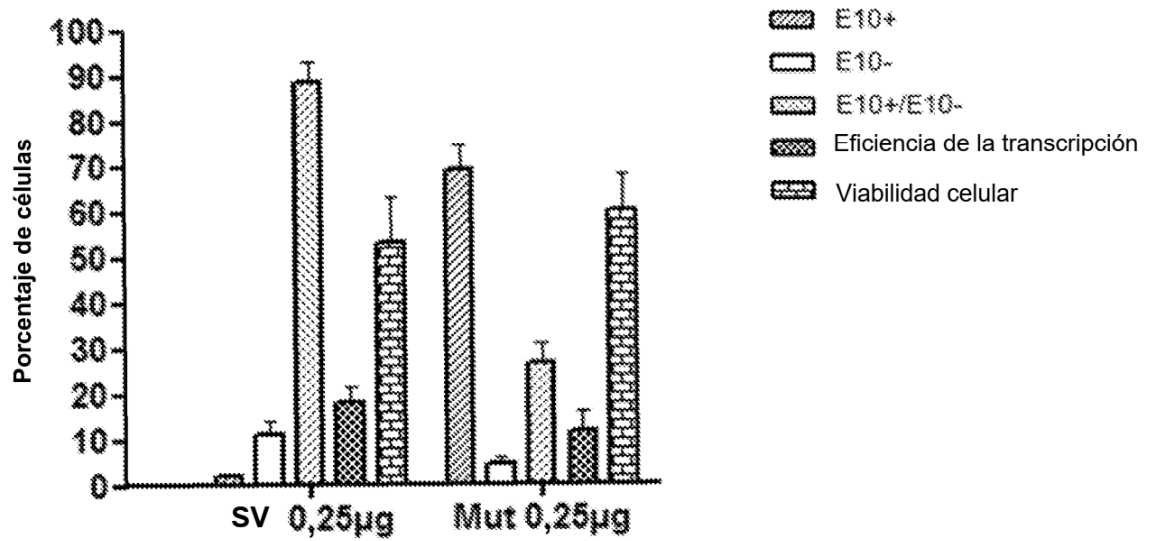


Figura 4



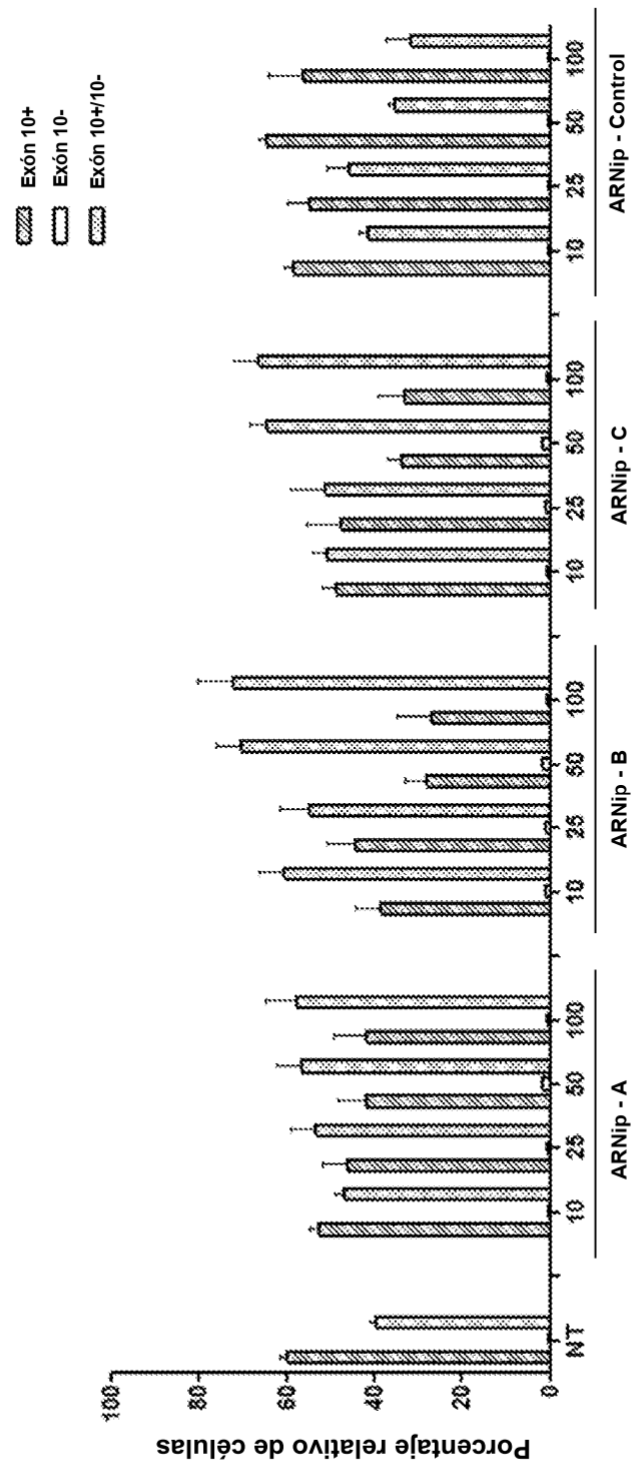


Figura 6

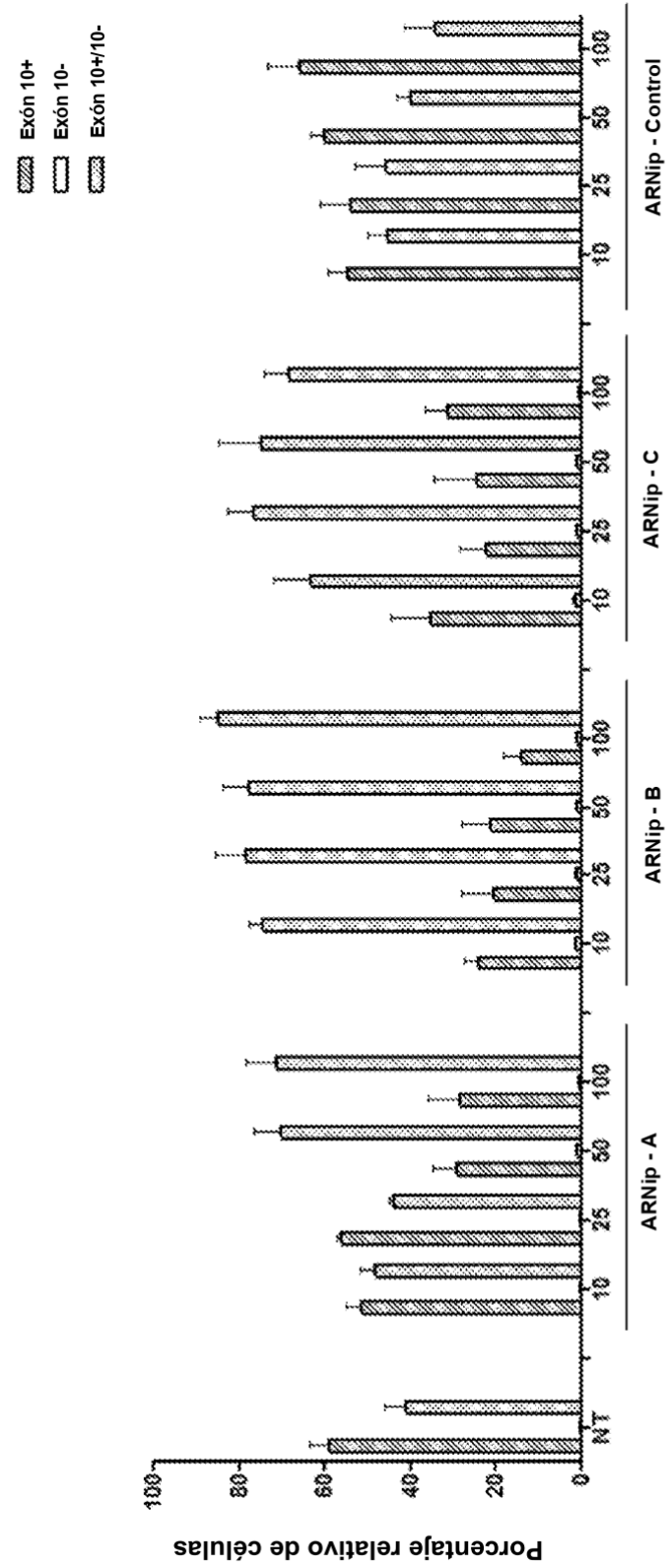


Figura 7

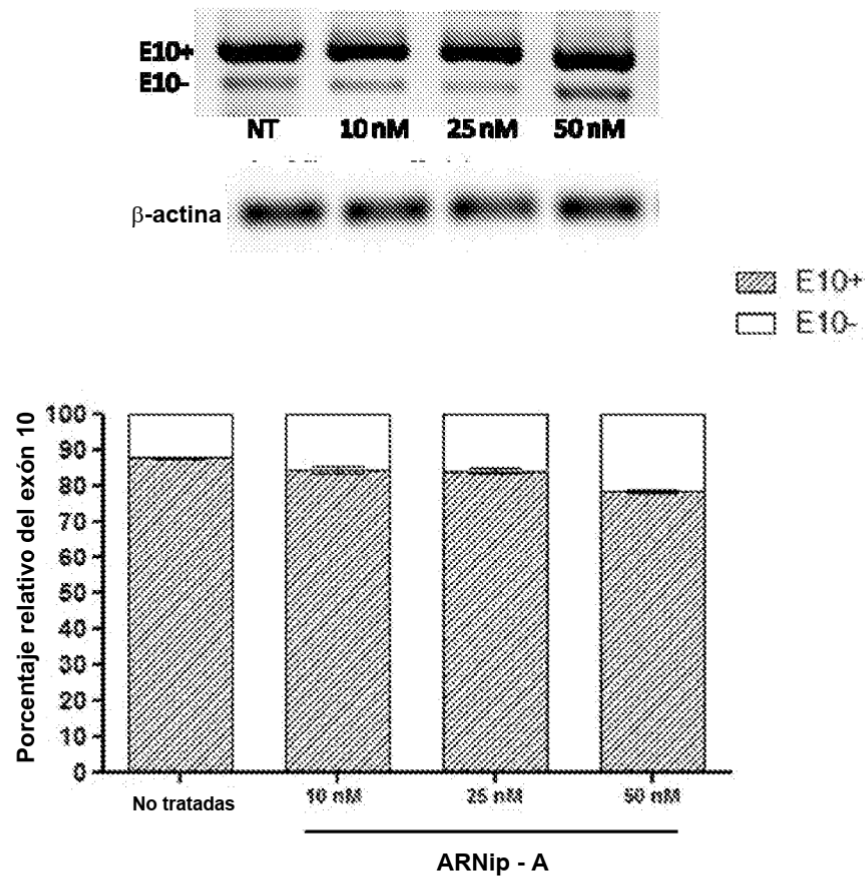


Figura 8

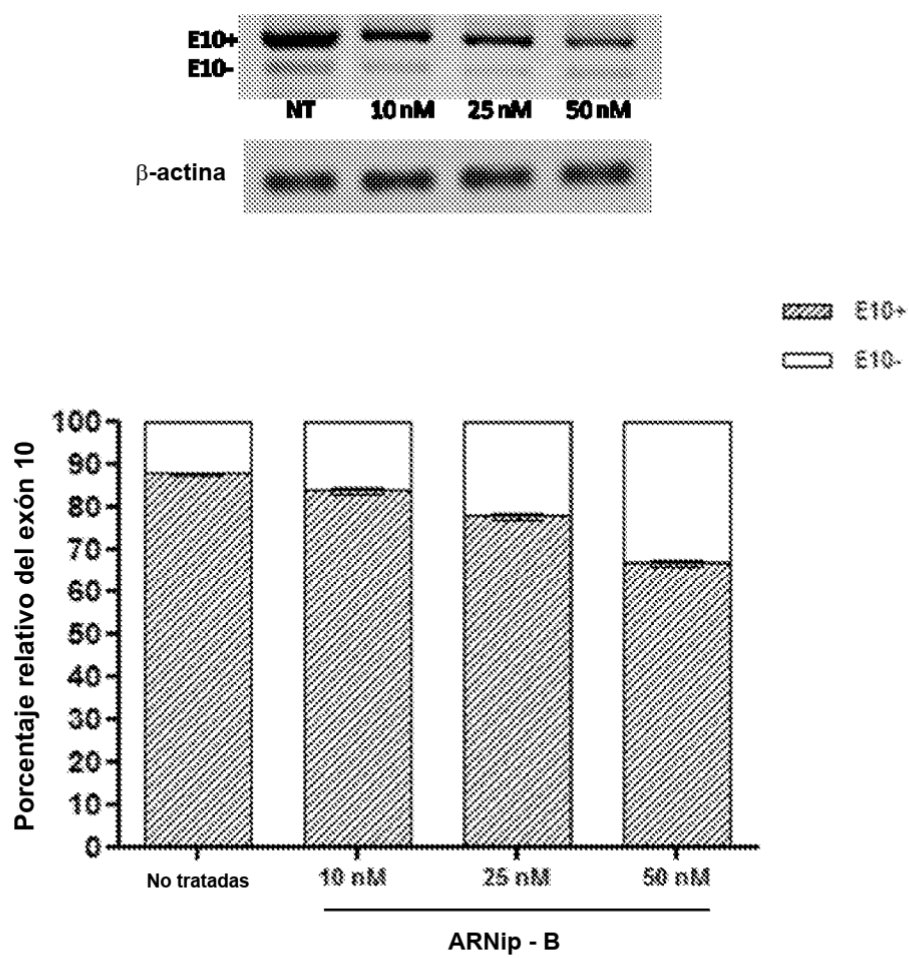


Figura 9

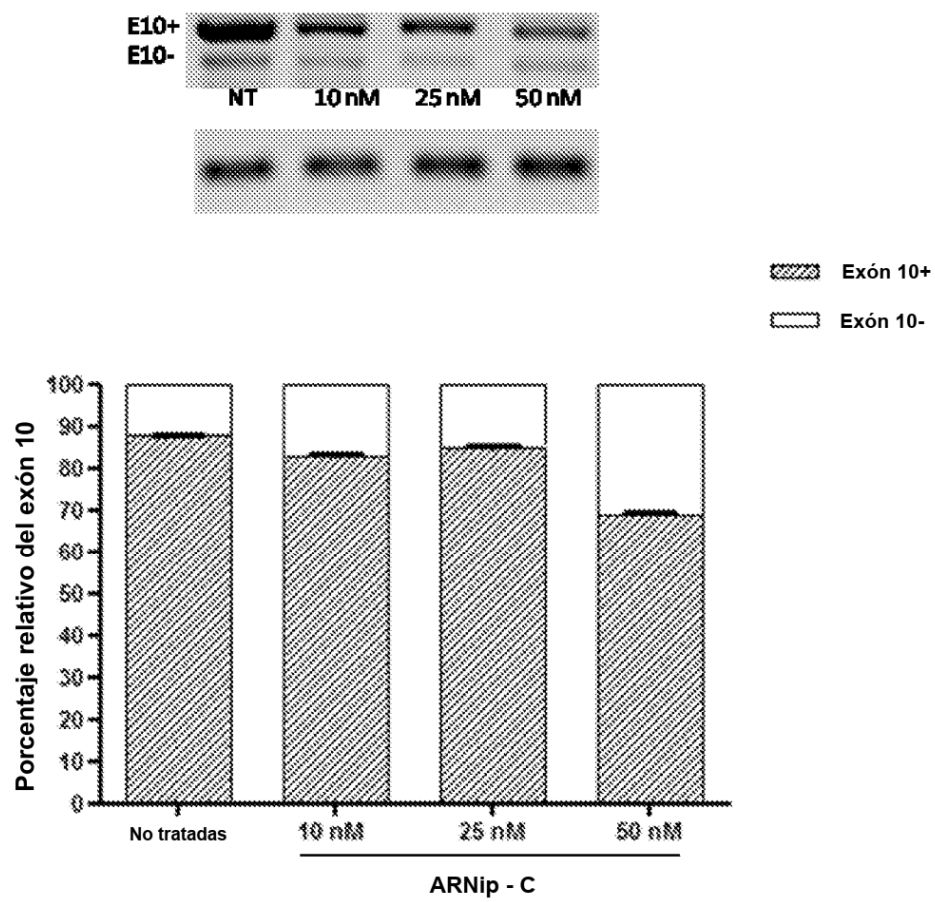


Figura 10

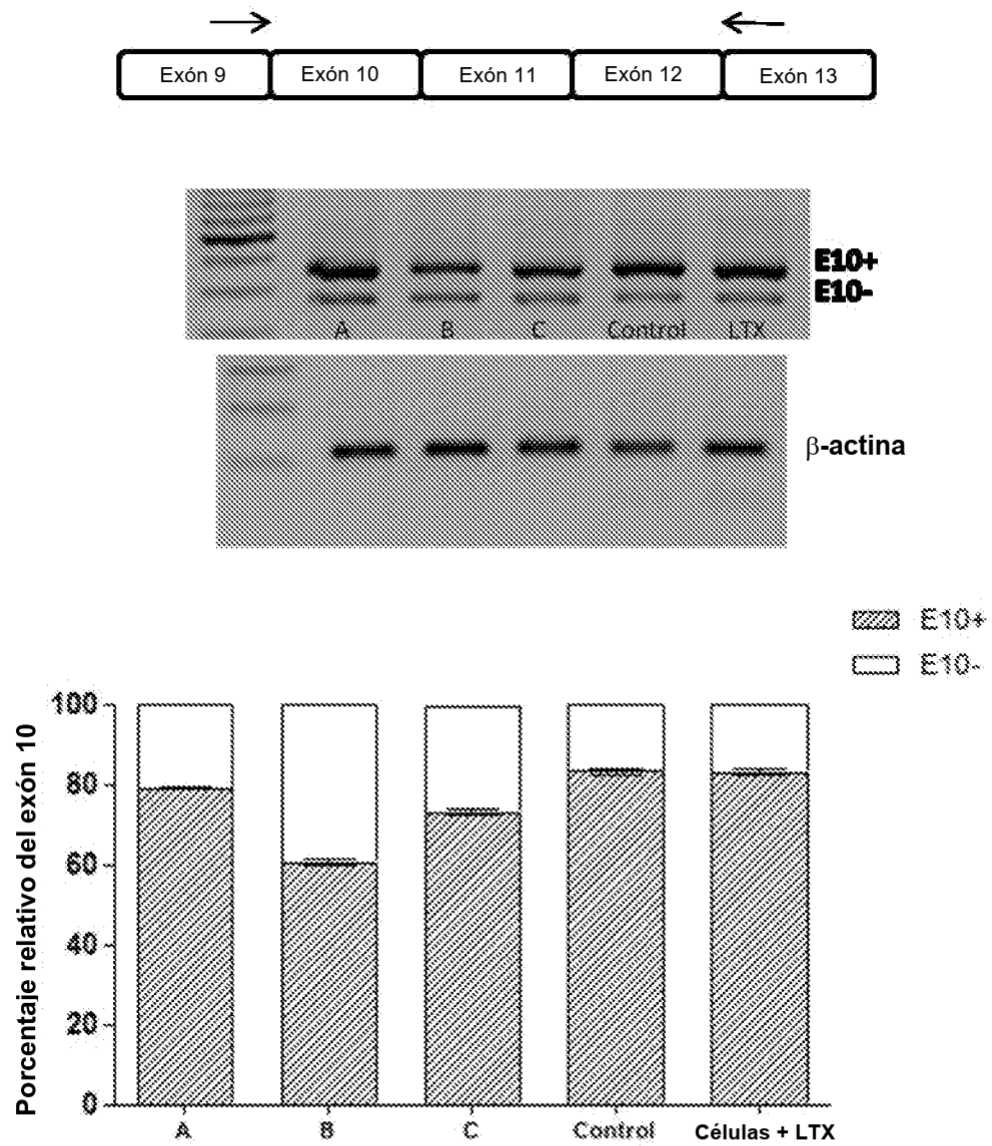


Figura 11

ES 2 820 713 T3

tagttattaa	tagtaatcaa	ttacggggtc	attagttcat	agcccatata	tggagttccg	60
cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgc	tggctgaccg	cccaacgacc	cccgcccatt	120
gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	aacgcccaata	gggactttcc	attgacgtca	180
atgggtggag	tatttacggt	aaactgcca	cttggcagta	catcaagtgt	atcatatgcc	240
aagtacgccc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	atgccagta	300
catgacctta	tgggactttc	ctacttgga	gtacatctac	gtattagtca	tcgctattac	360
catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	actcacgggg	420
atttccaagt	ctccaccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	aaaatcaacg	480
ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	gtaggcgtgt	540
acgggtggag	gtctatataa	gcagagctgg	tttagtgaa	cgtcagatcc	gctagcgcta	600
ccggactcag	atctaccatt	ggtgcacctg	actcctgagg	agaagtctgc	cgttactgcc	660
ctgtggggca	aggtgaacgt	ggaagagttg	gtggtgaggc	cctgggccac	cagtaagtat	720
caagggtaca	agacaggttt	aaggagacca	atagaaactg	ggcatgtgga	gacagagaag	780
actcttgggt	ttctgaattc	ctcatccttt	tttctggcta	ccaaagggtgc	agataattaa	840
taagaagctg	gatcttagca	acgtccagtc	caagtgtggc	tcaaaggata	atatcaaaca	900
cgtcccggga	ggcggcagtg	tgagtacctt	cacacgtccc	atgcgccgtg	ctgtggcctt	960
aattattagg	aagtgggtgtg	agtgcgtaca	cttgcgagac	actgcataga	ataaatcctt	1020
ctggatccac	catggtggct	tagatccggg	catgtggaga	cagagaagac	tgttgagttt	1080
gtgataagca	ctgactctct	ctgcctattg	gtctattttc	cctccctcag	tggcggctga	1140
ggacaaactc	tacgcggact	tgccagtacg	cttcgtgagc	aagggcgagg	agctgttcac	1200
cggggtgggtg	cccatcctgg	tcgagctgga	cggcgacgta	aacggccaca	agttcagcgt	1260
gtccggcgag	ggcgagggcg	acgccaccta	cggcaagctg	accctgaagt	tcactctgcac	1320
caccggcaag	ctgcccgtgc	cctggcccac	cctcgtgacc	accctgacct	acggcggtgca	1380
gtgcttttagc	cgctaccccc	accacctgaa	gcagcacgac	ttcttcaaga	gtgcaatgcc	1440
cgaaggctac	gtccaggagc	gcaccatctt	cttcaaggac	gacggcaact	acaagacccg	1500
cgcgaggtg	aagttcgagg	gcgacaccct	ggtgaaccgc	atcgagctga	agggcatcga	1560
cttcaaggag	gacggcaaca	tcctggggca	caagctggag	tacaactaca	acagccacaa	1620
cgtctatatc	accgccgaca	agcagaagaa	cggcatcaag	gtgaacttca	agatccgcca	1680
caacatcgag	gacggcagcg	tgcagctcgc	cgaccactac	cagcagaaca	cccccatcgg	1740
cgacggcccc	gtgctgctgc	ccgacaacca	ctacctgagc	accagtcctg	ccctgagcaa	1800
agaccccaac	gagaagcgcg	atcatatggt	cctgctggag	ttcgtgaccg	ccgcgggat	1860
cactctcggc	accgacgagc	tgtacaagta	accggtcgcc	accatggtga	gcaagggcga	1920
ggagaataac	atggccatca	tcaaggagtt	catgcgcttc	aaggtgcgca	tggagggctc	1980
cgtgaacggc	cacgagttcg	agatcgaggg	cgagggcgag	ggccgcccct	acgagggcac	2040
ccagaccgcc	aagctgaagg	tgaccaaggg	tggccccctg	cccttcgcct	gggacatcct	2100
aacccccaac	ttcacctacg	gctccaaggc	ctacgtgaag	caccccgccg	acatccccga	2160
ctacttgaag	ctgtccttcc	ccgagggctt	caagtgggag	cgcgtgatga	acttcgagga	2220

Figura 12

ES 2 820 713 T3

cggcggcgtg	gtgaccgtga	cccaggactc	ctccctgcag	gacggcgagt	tcattctacaa	2280
ggtgaagctg	cgcggcacca	acttcccctc	cgacggcccc	gtaatgcaga	agaagaccat	2340
gggctgggag	gcctcctccg	agcggatgta	ccccgaggac	ggcgccctga	agggcgagat	2400
caagatgagg	ctgaagctga	aggacggcgg	ccactacgac	gctgaggtca	agaccaccta	2460
caaggccaag	aagcccgtgc	agctgcccgg	cgctcatatc	gtcggcatca	agttggacat	2520
cacctcccac	aacgaggact	acaccatcgt	ggaactgtac	gaacgcgcgg	agggccgcca	2580
ctccaccggc	ggcatggacg	agctgtataa	gtaagcggcc	gcgactctag	atcataatca	2640
gccataccac	atthttagag	gttttacttg	ctttaaaaaa	cctcccacac	ctccccctga	2700
acctgaaaca	taaaatgaat	gcaattgttg	ttgttaactt	gtttattgca	gcttataatg	2760
gttacaataa	aagcaatagc	atcacaaatt	tcacaaataa	agcatttttt	tcactgcatt	2820
ctagtgtgtg	tttgtccaaa	ctcatcaatg	tatcttaagg	cgtaaatgtt	aagcgttaat	2880
atthtgttaa	aattcgcggt	aaatthtgtt	taaatcagct	cattthttaa	ccaataggcc	2940
gaaatcgcca	aaatccctta	taaatcaaaa	gaatagaccg	agatagggtt	gagtgtgtgt	3000
ccagtthtga	acaagagtcc	actattaaag	aacgtggact	ccaacgtcaa	agggcgaaaa	3060
accgtctatc	agggcgatgg	cccactacgt	gaaccatcac	cctaatacaag	thtthtgggg	3120
tcgaggtgcc	gtaaagcact	aaatcggaac	cctaaaggga	gcccccgatt	tagagcttga	3180
cggggaaagc	cgcggaacgt	ggcgagaaag	gaagggaaga	aagcgaaagg	agcgggcgct	3240
agggcgctgg	caagtgtagc	ggtcacgctg	cgcgtaacca	ccacacccgc	cgcgcttaat	3300
gcgcgctac	agggcgcgtc	aggtggcact	thtgggggaa	atgtgcgcgg	aacctctatt	3360
tgthtattth	tctaaataca	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	acctgataa	3420
atgcttcaat	aattattgaa	aagggaaggt	cctgaggcgg	aaagaaccag	ctgtggaatg	3480
tgtgtcagtt	aggggtgtga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	atgcaaagca	3540
tgcatctcaa	ttagttagca	accaggtgtg	gaaagtcccc	aggctcccca	gcaggcagaa	3600
gtatgcaaag	catgcatctc	aattagttag	caaccatagt	cccgccccta	actccgcccc	3660
thtccgcccc	aactccgccc	agthtccgccc	attctccgccc	ccatggctga	ctaattthtth	3720
thtthtattg	agaggccgag	gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	tagtgaggag	3780
gctthtthtgg	aggcctaggc	thtthtcaaag	atcgatcaag	agacaggatg	aggatcgtht	3840
cgcatgattg	aacaagatgg	attgcacgca	ggtthtccgg	ccgcttgggg	ggagaggcta	3900
thtggctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgccgccgt	gttccggctg	3960
tcagcgcagg	ggcgcccggg	thtthtthtgc	aagaccgacc	tgtccgggtgc	cctgaatgaa	4020
ctgcaagacg	aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcggtcc	ttgcgcagct	4080
gtgctcgacg	ttgtcactga	agcggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgcggggg	4140
caggatctcc	tgtcatctca	ccttgctcct	gccgagaaag	tatccatcat	ggctgatgca	4200
atgcggcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgcccac	tcgaccacca	agcgaaacat	4260
cgcatcgagc	gagcacgtac	tcggatggaa	gccggctctg	tcgatcagga	tgatctggac	4320
gaagagcatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	ggctcaaggc	gagcatgccc	4380
gacggcgagg	atctcgctcg	gacctatggc	gatgcctgct	tgccgaatat	catgggtgaa	4440
aatggccgct	thtctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	ccgctatcag	4500

Figura 12 - cont.

ES 2 820 713 T3

gacatagcgt	tggtacccg	tgatattgct	gaagagcttg	gcggcgaatg	ggctgaccgc	4560
ttcctcgtgc	tttacggtat	cgccgctccc	gattcgcagc	gcatcgcctt	ctatcgcctt	4620
cttgacgagt	tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	gcgacgcca	4680
acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	cgccttcta	tgaaagggtg	ggcttcggaa	4740
tcgttttccg	ggacgccggc	tggtatgatc	tccagcgcgg	ggatctcatg	ctggagttct	4800
tcgcccaccc	tagggggagg	ctaactgaaa	cacggaagga	gacaataccg	gaaggaaccc	4860
gcgctatgac	ggcaataaaa	agacagaata	aaacgcacgg	tgttggttcg	tttgttcata	4920
aacgcggggg	tcggtcccag	ggctggcact	ctgtcgatac	cccaccgaga	ccccattggg	4980
gccaatacgc	ccgcgtttct	tccttttccc	cacccacccc	cccaagttcg	ggtgaaggcc	5040
cagggtcgc	agccaacgtc	ggggcggcag	gccctgccat	agcctcaggt	tactcatata	5100
tacttttagat	tgatttaaaa	cttcattttt	aattttaaag	gatctaggtg	aagatccttt	5160
ttgataatct	catgacccaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttccactga	gcgtcagacc	5220
cogtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	5280
tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttggtt	gccggatcaa	gagctaccaa	5340
ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	5400
tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	5460
tgctaatacct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtcct	accgggttgg	5520
actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	5580
cacagcccag	cttgagcgga	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	5640
gagaaagcgc	cacgcttccc	gaaggagaaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	5700
tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgcttggtat	ctttatagtc	5760
ctgtcgggtt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	5820
ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttttacg	gttcctggcc	ttttgctggc	5880
cttttgctca	catgttcttt	cctgcgttat	cccctgattc	tgtggataac	cgtattaccg	5940
ccatgcat						5948

Figura 12 - cont.

ES 2 820 713 T3

tagttattaa	tagtaatcaa	ttacgggggtc	attagttcat	agcccatata	tggagttccg	60
cgttacataa	cttacggtaa	atggcccgc	tggctgaccg	cccaacgacc	cccgccatt	120
gacgtcaata	atgacgtatg	ttcccatagt	aacgccaata	gggactttcc	attgacgtca	180
atgggtggag	tattttacgt	aaactgccca	cttggcagta	catcaagtgt	atcatatgcc	240
aagtacgccc	cctattgacg	tcaatgacgg	taaatggccc	gcctggcatt	atgccagta	300
catgacctta	tgggactttc	ctacttggca	gtacatctac	gtattagtca	tcgctattac	360
catggtgatg	cggttttggc	agtacatcaa	tgggcgtgga	tagcggtttg	actcacgggg	420
atttccaagt	ctccacccca	ttgacgtcaa	tgggagtttg	ttttggcacc	aaaatcaacg	480
ggactttcca	aaatgtcgta	acaactccgc	cccattgacg	caaatgggcg	gtaggcgtgt	540
acgggtgggag	gtctatataa	gcagagctgg	tttagtgaac	cgtcagatcc	gtagcgcta	600
ccggactcag	atctaccatt	ggtgcacctg	actcctgagg	agaagtctgc	cgttactgcc	660
ctgtggggca	aggtgaacgt	ggaagagttg	gtggtgaggc	cctggggccac	cagtaagtat	720
caaggttaca	agacaggttt	aaggagacca	atagaaactg	ggcatgtgga	gacagagaag	780
actcttgggt	ttctgaattc	ctcatccttt	tttctggcta	ccaaagggtgc	agataattaa	840
gaagaagctg	gatcttagca	acgtccagtc	caagtgtggc	tcaaaggata	atatcaaaca	900
cgtcccggga	ggcggcagtg	tgagtacctt	cacacgtccc	atgcgccgtg	ctgtggcttg	960
aattattag	aagtgggtgtg	agtgcgtaca	cttgcgagac	actgcataga	ataaatcctt	1020
ctggatccac	catggtggct	tagatccggg	catgtggaga	cagagaagac	tgttgagttt	1080
gtgataagca	ctgactctct	ctgcctattg	gtctattttc	cctccctcag	tggcggtcga	1140
ggacaaactc	tacgcggact	tgccagtagc	cttcgtgagc	aagggcgagg	agctgttcac	1200
cggggtggtg	cccacctcgg	tcgagctgga	cggcgacgta	aacggccaca	agttcagcgt	1260
gtccggcgag	ggcgaggggc	acgccacctc	cggcaagctg	accctgaagt	tcactctcac	1320
caccggcaag	ctgcccgtgc	cctggccccac	cctcgtgacc	accctgacct	acggcgtgca	1380
gtgctttagc	cgctaccccc	accacctgaa	gcagcacgac	ttcttcaaga	gtgcaatgcc	1440
cgaaggctac	gtccaggagc	gcaccatctt	cttcaaggac	gacggcaact	acaagacccg	1500
cgccgaggtg	aagttcgagg	gcgacaccct	ggtgaaccgc	atcgagctga	agggcatcga	1560
cttcaaggag	gacggcaaca	tcctggggca	caagctggag	tacaactaca	acagccacaa	1620
cgtctatatc	accgccgaca	agcagaagaa	cggcatcaag	gtgaacttca	agatccgcca	1680
caacatcgag	gacggcagcg	tgagctcgc	cgaccactac	cagcagaaca	ccccatcgg	1740
cgacggcccc	gtgctgctgc	ccgacaacca	ctacctgagc	accagtcgg	ccctgagcaa	1800
agaccccaac	gagaagcgcg	atcatatggt	cctgctggag	ttcgtgaccg	ccgcccggat	1860
cactctcggc	accgacgagc	tgtacaagta	accggtcgcc	accatggtga	gcaagggcga	1920
ggagaataac	atggccatca	tcaaggagtt	catgcgcttc	aagggtcgca	tggagggctc	1980
cgtgaacggc	cacgagttcg	agatcgaggg	cgagggcgag	ggccgcccct	acgagggcac	2040
ccagaccgcc	aagctgaagg	tgaccaaggg	tggccccctg	cccttcgcct	gggacatcct	2100
aacccccaac	ttcacctacg	gtccaaggc	ctacgtgaag	caccccgccg	acatccccga	2160
ctacttgaag	ctgtccttcc	ccgagggctt	caagtgggag	cgcgtgatga	acttcgagga	2220

Figura 13

ES 2 820 713 T3

cggcggcgtg	gtgaccgtga	cccaggactc	ctccctgcag	gacggcgagt	tcctctacaa	2280
ggtgaagctg	cgcgccacca	acttcccctc	cgacggcccc	gtaatgcaga	agaagaccat	2340
gggctgggag	gcctcctccg	agcggatgta	ccccgaggac	ggcgccctga	agggcgagat	2400
caagatgagg	ctgaagctga	aggacggcgg	ccactacgac	gctgagggtca	agaccaccta	2460
caaggccaag	aagcccgtgc	agctgcccgg	cgcctacatc	gtcggcatca	agttggacat	2520
cacctccac	aacgaggact	acaccatcgt	ggaactgtac	gaacgcgcgg	agggccgcca	2580
ctccaccggc	ggcatggacg	agctgtataa	gtaagcggcc	gcgactctag	atcataatca	2640
gccataccac	attttagtag	gttttacttg	ctttaaaaaa	cctcccacac	ctccccctga	2700
acctgaaaca	taaaatgaat	gcaattgttg	ttgttaactt	gtttattgca	gcttataatg	2760
gttacaata	aagcaatagc	atcacaaatt	tcacaaataa	agcatttttt	tactgcatt	2820
ctagttgtgg	tttgtccaaa	ctcatcaatg	tatcttaagg	cgtaaattgt	aagcgtaaat	2880
attttgttaa	aattcgcgtt	aaatttttgt	taaatcagct	cattttttta	ccaataggcc	2940
gaaatcggca	aaatccctta	taaatcaaaa	gaatagaccg	agataggggt	gagtgttggt	3000
ccagtttgga	acaagagtcc	actattaaag	aacgtggact	ccaacgtcaa	agggcgaaaa	3060
accgtctatc	agggcgatgg	cccactacgt	gaaccatcac	cctaatacag	ttttttgggg	3120
tcgaggtgcc	gtaaagcact	aaatcggaac	cctaaaggga	gcccccgatt	tagagcttga	3180
cggggaaagc	cggcgaaagt	ggcgagaaag	gaagggaaga	aagcgaaagg	agcgggcgct	3240
agggcgctgg	caagtgtagc	ggtcacgctg	cgcgtaacca	ccacaccgcg	cgcgcttaat	3300
gcgcgcgtac	agggcgcgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccttatt	3360
tgtttatatt	tctaaataca	ttcaaataat	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	3420
atgcttcaat	aatattgaaa	aaggaagagt	cctgaggcgg	aaagaaccag	ctgtggaatg	3480
tgtgtcagtt	aggtgttgga	aagtccccag	gctccccagc	aggcagaagt	atgcaaagca	3540
tgcattctca	ttagtcagca	accaggtgtg	gaaagtcccc	aggtcccca	gcaggcagaa	3600
gtatgcaaag	catgcatctc	aattagtcag	caaccatagt	cccggcccta	actccgcca	3660
tcccggccct	aactccgccc	agttccgccc	attctccgcc	ccatggctga	ctaatttttt	3720
ttatttatgc	agagcccgag	gcgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	tagtgaggag	3780
gcttttttgg	aggcctaggc	ttttgcaaag	atcgatcaag	agacaggatg	aggatcgttt	3840
cgcattgatt	aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggg	ggagaggcta	3900
ttcggctatg	actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgccgcgct	gttccggctg	3960
tcagcgcagg	ggcgcccggg	tctttttgtc	aagaccgacc	tgtccgggtg	cctgaatgaa	4020
ctgcaagacg	aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcgttcc	ttgcgcagct	4080
gtgctcgacg	ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggcga	agtgccgggg	4140
caggatctcc	tgtcatctca	ccttgctcct	gccgagaaa	tatccatcat	ggctgatgca	4200
atgcggcggc	tgcatacgct	tgatccggct	acctgcccat	tcgaccacca	agcgaaacat	4260
cgcattcgagc	gagcacgtac	tcggatggaa	gccggtcttg	tcgatcagga	tgatctggac	4320
gaagagcatc	aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	ggctcaaggc	gagcatgccc	4380
gacggcgagg	atctcgtcgt	gacccatggc	gatgcctgct	tgccgaatat	catggtggaa	4440
aatggccgct	tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	ccgctatcag	4500
gacatagcgt	tggctacccg	tgatattgct	gaagagcttg	gcggcgaaatg	ggctgaccgc	4560

Figura 13 - cont.

ES 2 820 713 T3

ttcctcgtgc	tttacggtat	cgccgctccc	gattcgcagc	gcatcgcctt	ctatcgcctt	4620
cttgacgagt	tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	gcgacgcca	4680
acctgccatc	acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	ggcttcggaa	4740
tcgttttccg	ggacgccggc	tggatgatcc	tccagcgcgg	ggatctcatg	ctggagttct	4800
tcgcccaccc	tagggggagg	ctaactgaaa	cacggaagga	gacaataccg	gaaggaaccc	4860
gcgctatgac	ggcaataaaa	agacagaata	aaacgcacgg	tgttgggtcg	tttgttcata	4920
aacgcggggg	tcgggtcccag	ggctggcact	ctgtcgatac	cccaccgaga	ccccattggg	4980
gccaatacgc	ccgcgtttct	tccttttccc	cacccacccc	ccaagtctcg	ggtgaaggcc	5040
cagggctcgc	agccaacgtc	ggggcggcag	gccctgccat	agcctcaggt	tactcatata	5100
tacttttagat	tgattttaaaa	cttcattttt	aattttaaaag	gatctaggtg	aagatccttt	5160
ttgataatct	catgacaaaa	atcccttaac	gtgagttttc	gttcactga	gcgtcagacc	5220
ccgtagaaaa	gatcaaagga	tcttcttgag	atcctttttt	tctgcgcgta	atctgctgct	5280
tgcaaacaaa	aaaaccaccg	ctaccagcgg	tggtttgttt	gccggatcaa	gagctaccaa	5340
ctctttttcc	gaaggtaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaatact	gtccttctag	5400
tgtagccgta	gttaggccac	cacttcaaga	actctgtagc	accgcctaca	tacctcgctc	5460
tgctaatacct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcgtgtctt	accgggttgg	5520
actcaagacg	atagttaccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	5580
cacagcccag	cttgagcgca	acgacctaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	5640
gagaaagcgc	cacgcttccc	gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	5700
tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgcctggtat	ctttatagtc	5760
ctgtcggggt	tcgccacctc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	5820
ggagcctatg	gaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttttacg	gttcctggcc	ttttgctggc	5880
cttttgctca	catgttcttt	cctgcgttat	cccctgattc	tgtggataac	cgtattaccg	5940

Figura 13 - cont.