

OLIGONUCLEÓTIDOS Y COMPOSICIONES DE LOS MISMOS PARA TRASTORNOS NEUROMUSCULARES

REFERENCIA CRUZADA

- [1] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. N.º 63/221,568, presentada el 14 de julio de 2021, cuya descripción se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

- [2] Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en el presente documento por referencia en la misma medida como si se indicara específica e individualmente que cada publicación, patente o solicitud de patente se incorpora por referencia. En la medida en que las publicaciones y patentes o solicitudes de patente incorporadas por referencia contradigan la descripción contenida en la memoria descriptiva, se pretende que la memoria descriptiva reemplace y/o tenga preferencia sobre cualquiera de dichas materias contradictorias.

COMPENDIO

- [1] Ciertos aspectos de esta descripción se refieren a un oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado que tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado comprende al menos aproximadamente: 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 20 962 – 42 138. Además, el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado puede tener aproximadamente de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, puede comprender al menos aproximadamente 80%, 85%, 90% o 95% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 42 006 – 42 138.
- [2] En ciertos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado en donde el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado comprende un nucleótido de ADN y un nucleótido de ARN. En algunos casos, este oligonucleótido comprende un nucleótido de ADN. En algunos casos, el oligonucleótido comprende un nucleótido de ARN. En ciertos casos, el oligonucleótido es un ARN interferente pequeño (ARNip), un microARN (miARN), un ARN nuclear pequeño (ARNnp), un ARN de espliceosoma de U (U-ARN), un ARN nucleolar pequeño (ARNnop), un ARN que interacciona con Piwi (piARN), un

ARN interferente pequeño asociado a repetición (ARNipar), un ARN derivado de rADN pequeño (ARNrp), un ARN pequeño derivado de ARN de transferencia (ARNpt), un ARN pequeño derivado de ARN ribosómico (ARNpr), un ARN pequeño derivado de ARN no codificante grande (ARNpncg), o un ARN pequeño derivado de ARN mensajero (ARNpm). Un oligonucleótido como se describe anteriormente puede, en ciertos casos, comprender al menos una nucleobase de ácido nucleico bloqueado.

- [3] El oligonucleótido dirigido a DUX4 como se describe anteriormente puede unirse a la secuencia que codifica DUX4 en una solución acuosa con una temperatura de fusión (T_m) prevista de aproximadamente 45 a aproximadamente 65 grados Celsius, en donde la solución acuosa tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7.2 a aproximadamente 7.6.
- [4] Otro aspecto de esta descripción es un conjugado de un i) oligonucleótido dirigido a DUX4 como se describe anteriormente en donde el conjugado comprende el oligonucleótido y un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un dominio de anticuerpo variable único monomérico, un ligando de origen natural, una molécula pequeña o un péptido; y opcionalmente iii) un conector que une i) con ii).
- [5] Otro aspecto de la descripción se refiere a un vector que contiene o codifica el conjugado como se describe en el presente documento o un oligonucleótido como se describe en el presente documento. En ciertos casos, el vector puede comprender un vector viral, un vector de nanopartícula, un vector liposomal, un vector exosomal, un vector de vesícula extracelular o una combinación de los mismos. El vector puede ser el vector liposomal. El vector puede ser el vector de nanopartícula. El vector puede ser el vector exosomal. El vector puede ser el vector extracelular.
- [6] Otro aspecto de esta descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado descrito en el presente documento, el conjugado descrito en el presente documento, un vector como el vector descrito en el presente documento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, y un excipiente, diluyente, vehículo farmacéuticamente aceptable o una combinación de los mismos. En ciertos casos, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende un agente de tamponamiento, un estabilizante, un antioxidante, un diluyente o cualquier combinación de los mismos. En ciertos casos, el diluyente farmacéuticamente aceptable comprende agua destilada, agua desionizada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de

dextrosa, un medio de crecimiento celular, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier combinación de los mismos. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden estar en forma de dosis unitaria.

- [7] Otro aspecto de esta descripción se refiere a un kit que comprende el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado como se describe en el presente documento, el conjugado como se describe en el presente documento, el vector como se describe en el presente documento o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento y un envase. En ciertos casos, el envase puede comprender un frasco, una ampolla, una jeringa, una bolsa, una caja o una combinación de los mismos.
- [8] Otro aspecto de esta descripción es un método para tratar una enfermedad o afección en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica como se describe en el presente documento. La enfermedad o afección es una enfermedad o afección mediada por DUX4. La enfermedad o afección mediada por DUX4 es distrofia muscular facioescapulohumeral. El sujeto puede ser un sujeto que lo necesite. El sujeto puede ser un sujeto humano que lo necesite.
- [9] En el método, la administración es en una cantidad de aproximadamente 0.001 mg a aproximadamente 10 000 mg de la formulación farmacéutica por kg de peso corporal del sujeto. La administración puede ser oral, intranasal, rectal, tópica, intraocular, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intracardiaca, subcutánea, intracraneal, intratecal o cualquier combinación de las mismas.
- [10] El método puede usar la composición farmacéutica en donde la composición farmacéutica es una forma farmacéutica líquida que se administra en un volumen de: aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 5 ml a 10 ml, de aproximadamente 15 ml a aproximadamente 20 ml, de aproximadamente 25 ml a aproximadamente 30 ml, de aproximadamente 30 ml a aproximadamente 50 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 100 ml, de aproximadamente 100 ml a 150 ml, de aproximadamente 150 ml a aproximadamente 200 ml, de aproximadamente 200 ml a aproximadamente 250 ml, de aproximadamente 250 ml a aproximadamente 300 ml, de aproximadamente 300 ml a aproximadamente 350 ml, de aproximadamente 350 ml a aproximadamente 400 ml, de aproximadamente 400 ml a aproximadamente 450 ml, de aproximadamente 450 ml a 500 ml, de aproximadamente 500 ml a 750 ml, o de aproximadamente 750 ml a 1000 ml. En ciertos casos, la composición farmacéutica está en una forma farmacéutica líquida, una forma farmacéutica sólida, una forma farmacéutica

inhalable, una forma farmacéutica intranasal, una formulación liposomal, en forma de una píldora, en forma de una cápsula o cualquier combinación de las mismas.

[11] En ciertos casos, la administración comprende administración sistémica o local. La administración puede ser sistémica, en donde la administración sistémica comprende al menos uno de: una administración parenteral, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intratecal, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intravascular, infusión, administración oral, administración por inhalación, administración intraduodenal, administración rectal, o cualquier combinación de las mismas.

[12] En ciertos casos, el método comprende además administrar de forma simultánea o consecutiva un cotratamiento.

[13] Otro aspecto de la descripción se refiere a un método de administración del oligonucleótido dirigido a DUX-4 genomanipulado descrito en el presente documento, en donde después de la administración, el oligonucleótido dirigido a DUX-4 genomanipulado se hibrida selectivamente con dos ARN endógenos diferentes relacionados con la enfermedad, en donde uno de los dos ARN endógenos diferentes relacionados con la enfermedad es un ARN de DUX4 transcrito a partir de un primer locus genético y uno de los dos ARN endógenos diferentes relacionados con la enfermedad se transcribe a partir de un locus genético diferente del primer locus genético. Además también, en ciertos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado se hibrida con el ARN endógeno relacionado con la enfermedad que se transcribe de un locus genético diferente del primer locus genético, de modo que al menos 10 oligonucleótidos continuos del oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado se hibridan con al menos dos secciones contiguas diferentes de bases contiguas que están interrumpidas por al menos una nucleobase. Este método puede ser un método para tratar una enfermedad o afección que sea una enfermedad o afección mediada por DUX4. La enfermedad o afección puede ser distrofia muscular facioescapulohumeral. Tras la hibridación entre el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado y el segundo ARN, el punto de fusión térmica previsto puede ser de aproximadamente 40 grados Celsius a aproximadamente 65 grados Celsius.

[14] Otro aspecto de esta descripción es una composición para usar en el tratamiento de una enfermedad neuromuscular que comprende un oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado como se describe en el presente documento, un conjugado como se describe en el presente documento, un vector como se describe en el presente documento, una composición farmacéutica como se describe en el presente documento y un excipiente,

diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede ser para usar donde la enfermedad neuromuscular es distrofia muscular facioescapulohumeral.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- [15] La **FIG. 1** muestra modificaciones genéticas que conducen a FSHD.
- [16] La **FIG. 2** muestra transcritos de DUX4 de corte y empalme alternativo procedentes de regiones D4Z4.
- [17] La **FIG. 3** muestra un esquema de la cobertura de lecturas de datos de RNA-Seq de transcritos de DUX4 de corte y empalme alternativo de tejido de biopsia de FSHD y músculo sano.
- [18] La **FIG. 4** muestra un esquema de la cobertura de lecturas de datos de RNA-Seq de transcritos de DUX4 de corte y empalme alternativo de testículo.
- [19] La **FIG. 5** muestra la estabilidad en suero de los ASO anti-DUX4 modificados químicamente en relación con oligos no modificados.
- [20] Las **FIGs. 6A-B** representan la reducción de la estimulación innata. La **FIG. 6A** representa reducciones de la producción de IFN α y TNF α innata después de exposición de PBMC a los ASO anti-DUX4 genomanipulados. La **FIG. 6B** representa reducciones de la inmunoestimulación innata para los ASO de DUX4 genomanipulados por medio del ensayo de células Raw-Blue.
- [21] La **FIG. 7** muestra un diseño de ensayo de HTS de ASO de DUX4 con mioblastos humanos o de ratón estables que expresan eGFP con la secuencia que codifica DUX4 en la 3' UTR.
- [22] Las **FIGs. 8A-B** muestran la reducción de la expresión de ARNm de DUX4. La **FIG. 8A** muestra que los ASO terapéuticos tienen una fuerte reducción de la expresión de DUX4 en miotubos en la FSHD. La **FIG. 8B** muestra la reducción de la expresión de DUX4 y los genes ZSCAN4 y SLC34A2 inducidos por DUX4 en miotubos en la FSHD.
- [23] La **FIG. 9** muestra la reducción de la expresión de DUX4 y transcritos de ARN de DBET en mioblastos de pacientes con FSHD mediante ASO multidirigidos.
- [24] La **FIG. 10** muestra una visión esquemática del análisis de datos para identificar los genes y las rutas relacionados con la FSHD.
- [25] La **FIG. 11** muestran la expresión de genes que representan seis funciones biológicas relevantes en la FSHD separados por espacios horizontales (de arriba a abajo): regulado por DUX4, matriz extracelular, ciclo celular, respuesta inmunitaria/inflamatoria, inmunoglobulina y relacionado con el desarrollo muscular

- [26] Las **FIGs. 12A-B** muestran rutas de ejemplo para posibles efectos por las codianas identificadas. La **FIG. 12A** muestra regulaciones de rutas de Ki-67 en la proliferación celular de Xie *et al.* (18). La **FIG. 12B** muestra la inducción de IRF5 en la señalización inflamatoria de Elkon *et al.* (19).
- [27] La **FIG. 13** muestra la expresión de ARN de IRF5 y MKI67 en muestras de biopsias de pacientes.
- [28] Las **FIGs. 14A-B** muestran la validación de los transcritos codirigidos por ASO multidirigidos. La **FIG. 14A** muestra mioblastos después de tratamiento con los ASO. La **FIG. 14B** muestra los resultados de la qRT-PCT del ARN (DUX4, DBET, IRF5 y MKI67) obtenidos de los mioblastos tratados con los ASO.
- [29] La **FIG. 15** es un diagrama que muestra un método y sistema como se describe en el presente documento.
- [30] La **FIG. 16** muestra un sistema de control informático que está programado para analizar material genético.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Visión general

- [31] [0002] La distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD) es la tercera forma más común de distrofia muscular (MD), presentando síntomas aproximadamente 40 000 pacientes en los EE. UU. (1, 2). La FSHD tipo 1 (FSHD1), que representa el 95% de todos los pacientes con FSHD, es el resultado de una reducción en el número de repeticiones D4Z4 en el cromosoma 4q35 de aproximadamente 100 a menos de 11 (3). La FSHD tipo 2 (SHD2) es el resultado de una mutación de pérdida de función en el factor epigenético, mantenimiento estructural de los cromosomas del dominio de bisagra flexible que contiene 1 (SMCHD1) (3) (**FIG. 1**). Ambas mutaciones hereditarias dan como resultado la hipometilación de la región D4Z4, lo que permite la expresión inapropiada del gen de la proteína doble homeótica 4 (DUX4) codificada dentro de D4Z4. La expresión aberrante de DUX4 es gravemente tóxica para los tejidos musculares, produciendo estrés oxidativo y apoptosis de las células musculares, lo que degrada la función muscular (4, 5). La FSHD produce debilidad progresiva en los músculos de la cara, hombros, brazos, abdomen y piernas. Aproximadamente 20% de los pacientes a la larga necesitan silla de ruedas (6). Cuando solo quedan 1-3 repeticiones de D4Z4, se produce un trastorno mucho más grave y de rápida progresión (7), a menudo con inicio pediátrico (8) y pérdida de audición y visión

(9). Existe un amplio consenso científico en el campo de que si se pudiera eliminar la expresión de DUX4 en el tejido muscular, se podría detener la progresión de la FSHD1 y 2 (10-12). Varios estudios han mostrado que los productos terapéuticos de oligonucleótidos de ARN tienen el potencial de reprimir directamente DUX4, revirtiendo la patología muscular in vitro y en modelos de ratón (13-16). Sin embargo, la conservación del sitio de unión complementario de los productos terapéuticos de oligonucleótidos dirigidos a DUX4 sigue siendo un problema.

[32] Los oligonucleótidos terapéuticos (ONT) diseñados para tratar cualquier trastorno serán los más efectivos para regular el transcrito diana si son perfectamente complementarios del sitio de unión del ARN diana en el transcrito de la enfermedad. Además, la secuencia de unión dirigida debería tener una variación baja entre los pacientes con este trastorno. De lo contrario, los pacientes que tienen un SNP o una mutación en la secuencia del gen de la enfermedad en el sitio de unión diana pueden no ser perfectamente complementarios con el oligonucleótido terapéutico, lo que da como resultado un silenciamiento menos que completo del gen de la enfermedad por el ONT. La presente solicitud es la primera en resolver el problema de determinar secuencias variantes conservadas dentro del gen/exones de DUX4, para identificar ARN terapéuticos que se dirigen a variantes de DUX4 clínicamente significativas y para generar ARN terapéuticos con modificaciones estructurales superiores para la eficacia y estabilidad.

[33] Normalmente, se usan bases de datos de secuencias que incluyen de cientos a miles de individuos para seleccionar sitios de unión altamente conservados para los oligonucleótidos terapéuticos (ONT) (20). Sin embargo, estas bases de datos no se pueden usar para predecir con precisión la variación en el gen de DUX4. El desafío es encontrar dianas terapéuticas conservadas de DUX4. En el presente documento se describe la solución y la generación y validación de oligonucleótidos dirigidos a DUX4. La mayoría de las bases de datos de secuencias públicas usan tecnologías de secuenciación de fragmentos de ADN para recopilar datos de secuencias de poblaciones de manera eficiente y económica. Esto implica la fragmentación de ADN genómico largo en trozos de unos pocos cientos de bases de longitud que se clonan, amplifican y secuencian. Luego, los fragmentos individuales se mapean respecto a una secuencia genómica de referencia conocida más grande. Se sabe que esta tecnología no es eficaz para distinguir o mapear con precisión secuencias repetitivas (21).

[34] Las regiones que codifican el gen DUX4 residen en cada repetición D4Z4 en el cromosoma 4. El ADN de un individuo normal contiene 11-200 copias de D4Z4 en cada

cromosoma 4 (12). Además, se encuentran repeticiones D4Z4 que contienen DUX4 en el cromosoma 10. Sin embargo, la delección de repeticiones D4Z4 en el cromosoma 10 no está asociada con el desarrollo de distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD) debido a la falta de exones secuencia abajo 3-5 en la secuencia que codifica DUX4. Por lo tanto, la variabilidad de secuencia encontrada en las secuencias que codifican DUX4 del cromosoma 10 no sería relevante para el diseño de los ONT. Además, también se encuentran pseudogenes D4Z4 en todo el genoma humano (22) y se produce un solapamiento de secuencias significativo entre las secuencias de DUX4 en D4Z4 y otras secuencias de ADN repetitivas que codifican miembros de la familia DUX DUX1-DUX5 (23). Esta complejidad genómica conduce a un mapeo deficiente de los fragmentos de ADN secuenciados que solapan con las repeticiones D4Z4, con poca confianza en cuales son los locus genómicos de los que proceden. Al predecir la variación en la secuencia que codifica DUX4 en pacientes con FSHD se crea un problema de modo que hay poca confianza en que los datos de secuencias y la variación citada puedan predecir con precisión secuencias conservadas en DUX4, ya que muchos de los datos están contaminados con variaciones de secuencia de otros lugares genómicos que no se relacionan con la matriz de repeticiones D4Z4 acortada que causa la enfermedad, situada en una copia del cromosoma 4 de un paciente con FSHD. Una solución lógica sería utilizar datos de secuencias de ARN de biopsias musculares de pacientes con FSHD. Como se muestra en el Ejemplo 1, este enfoque no da como resultado datos suficientes para permitir la predicción de la variabilidad en la secuencia que codifica DUX4.

[35] Esta descripción es la primera en resolver el problema de determinar secuencias variantes conservadas dentro del gen/exones de DUX4, para identificar ONT terapéuticos que se dirigen a variantes de DUX4 clínicamente significativas y para generar ONT terapéuticos con modificaciones estructurales superiores para la eficacia y estabilidad.

[36] En el presente documento se describen secuencias que representan todas las regiones de la secuencia que codifica DUX4 que están >85% conservadas entre 206 sujetos (**Tabla 4**). Para identificar estas regiones, los autores de la invención hicieron el sorprendente descubrimiento, como se muestra en el Ejemplo 3, de que se podían identificar suficientes recuentos de lecturas en datos de RNA-seq combinando datos de RNA-seq de biopsias musculares de pacientes en una base de datos combinada con RNA-seq de muestras de testículo. Aunque se sabe en la técnica que se observa nivel bajo de expresión de DUX4 en células de gametos en los testículos (24), un experto en la técnica no habría esperado poder predecir la variación de transcrito de DUX4 de la enfermedad a partir de la secuencia de

ARN de testículo ya que se ha descrito que los transcritos de DUX4 expresados en los testículos están cortados y empalmados de modo diferente y carecen de regiones de exón1, exón2 y exón3 que están incluidas en los transcritos específicos de músculo para DUX4 que se predice que causarán la enfermedad (25) (**FIG. 2**). Al combinar los datos de RNA-seq de estos dos tejidos en un solo conjunto de datos, se pudo generar una cobertura de lecturas suficiente de todo el gen DUX4 de la enfermedad para predecir regiones que están más de 85% conservadas y que podrían tratar eficazmente a la mayoría de los pacientes.

[37] Los oligonucleótidos antisentido (ASO) que dependen de la RNasa H para la escisión y posterior degradación del ARN complementario, pueden silenciar y silencian muchos ARN además del ARN diana previsto (26, 27). Estos ARN no diana a menudo se denominan efectos fuera de la diana (*off-target*). Para los ASO gapmers, esto ocurre cuando la parte de ADN del oligonucleótido produce la degradación no intencionada de ARN fuera de la diana al unirse a un sitio diana parcialmente complementario e inducir la escisión por la RNasa H. Un análisis cuidadoso de la secuencia puede identificar muchas de estas posibles interacciones. Sin embargo, el alineamiento simple de secuencias a menudo no predice con precisión una interacción real fuera de la diana. Los autores de la invención han desarrollado una línea de análisis de datos para predecir y rastrear efectos fuera de la diana para ARN terapéuticos que considera el motivo estructural y la energía de unión, así como para mejorar las predicciones (publicación internacional W02021203043).

[38] La práctica general en este campo es evitar efectos fuera de la diana tanto como sea posible en el diseño de oligonucleótidos. El enfoque novedoso descrito en el presente documento es, en cambio, examinar de forma global los sitios fuera de la diana. Los autores de la invención primero buscan aquellos que serían potencialmente dañinos y causarían toxicidad filtrando las dianas previstas a través de bases de datos de toxicidad tales como Toxnet e Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Los autores de la invención también consideran los sitios fuera de la diana que puedan estar relacionados con las rutas de la enfermedad mediante el análisis de perfiles transcriptómicos de biopsias de músculo de pacientes con FSHD, buscando genes que estén significativamente sobreexpresados en subconjuntos o relacionados con rutas de enfermedad conocidas tales como la inflamación, división de células musculares o rutas de muerte celular.

[39] Esta información permite priorizar qué secuencias de ASO sintetizar, ensayar y validar. Los ASO que demuestran un alto potencial de reducción de la expresión y sitios fuera de la diana con alta relevancia para la enfermedad se usan entonces para validar la reducción de

la expresión del transcrito fuera de la diana in vitro en miotubos diferenciados por qRT-PCR.

Definiciones

- [40] A menos que se indique lo contrario, términos abiertos, por ejemplo "contiene", "que contiene", "incluye", "que incluye" y similares significan que comprende.
- [41] Las formas singulares "un", "una" y "el", "la" se usan en el presente documento para incluir referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en esta solicitud son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades que se desean obtener.
- [42] Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" puede significar la indicación numérica a la que se hace referencia más o menos 5%, 10%, 15% o 20% de esa indicación numérica a la que se hace referencia. En algunos casos, "aproximadamente" puede significar la indicación numérica a la que se hace referencia más o menos 15% de esa indicación numérica a la que se hace referencia. En algunos casos, "aproximadamente" puede significar la indicación numérica a la que se hace referencia más o menos 20% de esa indicación numérica a la que se hace referencia. Con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, dentro de 5 veces o dentro de 2 veces, de un valor. Cuando se describen valores particulares en la descripción y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, se debe asumir que el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular. Además, cuando se proporcionan intervalos y/o subintervalos de valores, los intervalos y/o subintervalos pueden incluir los puntos finales de los intervalos y/o subintervalos.
- [43] El término "sustancialmente", como se usa en el presente documento, puede referirse a un valor que se aproxima a 100% de un valor dado. En algunos casos, el término puede referirse a una cantidad que puede ser al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% o aproximadamente el 100% de la cantidad total.
- [44] El término "homología" puede referirse a un % de identidad de una secuencia con una secuencia de referencia. Como cuestión práctica, si cualquier secuencia particular puede ser al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a cualquier secuencia descrita en el presente documento (que puede corresponder a una

secuencia de ácido nucleico particular descrita en el presente documento), dicha secuencia polipeptídica particular se puede determinar convencionalmente usando programas informáticos conocidos tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin. 53711). Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia en particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se pueden ajustar de manera que el porcentaje de identidad se calcule respecto a toda la longitud de la secuencia de referencia y que se permitan huecos en la homología de hasta 5% de la secuencia de referencia total. Cualquier secuencia descrita en el presente documento también comprende una secuencia con aproximadamente: 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia descrita.

[45] El término "oligonucleótido" puede referirse a una secuencia de ADN, ARN o ácido nucleico híbrido, ya sea modificada químicamente o no, en donde una única hebra, tal como por ejemplo, en el caso típico del ADN, se une de forma inversa complementaria a una secuencia de ARN diana. En el caso del ARN, el oligonucleótido puede ser monocatenario, como es el caso típicamente del miARN, en donde la hebra sencilla se une de forma inversa complementaria a una secuencia de ARN diana. En otros casos, en relación a un oligonucleótido de ARN puede ser bicatenario, por ejemplo, como es típicamente el caso con el ARNip, en donde una hebra se une de forma inversa complementaria a una secuencia de ARN diana.

[46] Como se usa en el presente documento, en algunos casos, el término "que se dirige" y el término "dirigido" se pueden usar indistintamente, por ejemplo, un oligonucleótido que se dirige a DUX4 puede ser un oligonucleótido dirigido a DUX4 o un oligonucleótido que se dirige a DUX4. Puede ser un oligonucleótido dirigido a DUX4. Una secuencia dirigida puede tener complementariedad inversa con un transcrito de DUX4. En algunos casos, una secuencia dirigida puede tener al menos complementariedad inversa parcial con un transcrito de DUX4 y uno más locus genéticos adicionales, o transcritos de los mismos. En algunos casos, los locus genéticos

[47] El término "fragmento", tal como se usa en el presente documento, puede ser una parte de una secuencia, un subconjunto que puede ser más corto que una secuencia de longitud completa. Un fragmento puede ser una parte de un gen. Un fragmento puede ser una parte de un péptido o proteína. Un fragmento puede ser una parte de una secuencia de

aminoácidos. Un fragmento puede ser una parte de una secuencia de oligonucleótidos. Un fragmento puede tener menos de aproximadamente: 20, 30, 40, 50 aminoácidos de longitud. Un fragmento puede tener menos de aproximadamente: 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 oligonucleótidos de longitud.

[48] La expresión “marcador epigenético” como se usa en el presente documento, puede ser cualquier modificación covalente de una base de ácido nucleico.

[49] Los términos "administrar", "administra", "administración" y similares, como se usan en el presente documento, pueden referirse a métodos que pueden usarse para permitir el suministro de compuestos o composiciones en el sitio deseado de acción biológica. El término "suministrar" puede incluir la aplicación directa al tejido o región del cuerpo afectada.

[50] Los términos "sujeto", "hospedante", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a animales, típicamente animales mamíferos.

[51] Los términos "tratar", "trata" o "tratamiento", como se usan en el presente documento, pueden incluir al menos parcialmente: aliviar, disminuir o mejorar un síntoma de una enfermedad o afección; prevenir un síntoma adicional; mejorar o prevenir las causas subyacentes de un síntoma; prevenir la recurrencia de un síntoma; inhibir la enfermedad o afección, p. ej., al menos detener parcialmente un desarrollo de la enfermedad o afección; aliviar una enfermedad o afección; causar la remisión de una enfermedad o afección; aliviar una afección causada por la enfermedad o afección; o detener un síntoma de la enfermedad o afección ya sea de forma profiláctica, terapéutica o ambas.

[52] Como se usa en el presente documento, "agente" o "agente biológicamente activo" puede referirse a un compuesto biológico, farmacéutico o químico o una sal de cualquiera de estas estructuras.

[53] El término "tejido", como se usa en el presente documento, puede ser cualquier muestra de tejido. Un tejido puede ser un tejido que se sospecha o está confirmado que tiene una enfermedad o afección.

[54] La expresión "célula de mamífero" puede referirse a cualquier célula de mamífero, típicamente una célula humana.

Oligonucleótidos dirigidos a DUX4 genomanipulados

[55] La descripción del presente documento proporciona el dirigir el producto terapéutico de transcritos de ARN que comprenden un sitio diana de DUX4 seleccionado. En la medicina del ARN se emplean dos métodos principales: la interferencia mediada por ARN

bicatenario (iARN) y los oligonucleótidos antisentido (ASO). En términos generales, la iARN puede funcionar activando ribonucleasas que, junto con otras enzimas y complejos, degradan de forma coordinada el ARN después de que el ARN diana original se haya cortado en trozos más pequeños. Los oligonucleótidos antisentido pueden unirse a su ácido nucleico diana mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick e inhibir o alterar la expresión génica por medio de impedimento estérico, alteraciones de corte y empalme, inicio de la degradación de la diana u otros sucesos.

[56] En ciertos aspectos de la descripción, se pueden diseñar oligonucleótidos terapéuticos (ONT) para tratar cualquier trastorno sensible a la regulación de un transcrito dirigido. En ciertos aspectos, el tratamiento es con uno o más ASO sustancial o perfectamente complementarios con respecto a un sitio de unión del ARN diana de una enfermedad que tiene un transcrito que necesita regulación por disminución. En ciertos casos, los oligonucleótidos terapéuticos son principalmente ADN, en otros casos, los oligonucleótidos son principalmente ARN. Generalmente, los ASO que se dirigen eficazmente a DUX4 pueden unirse al transcrito de fusión e inducir la degradación a través de la ARNasa H.

[57] En otros aspectos de la descripción, el ARN interferente tal como ARNip o miARN que comprende una secuencia que es complementaria de un transcrito de ARN de DUX4 se puede diseñar para tratar cualquier trastorno sensible a la regulación de dicho transcrito dirigido. En ciertos aspectos, un ARNip es bicatenario siendo una de las hebras complementaria. RISC usa la hebra guía del miARN o ARNip para dirigirse a regiones complementarias 3' no traducidas (3'UTR) de transcritos de ARNm por medio del emparejamiento de bases de Watson-Crick, permitiendo regular la expresión génica del transcrito de ARNm de varias maneras, tal como la degradación del ARNm, previniendo o reduciendo así la expresión proteica del ARNm seleccionado.

[58] Los oligonucleótidos mencionados, pueden comprender miARN. Dicho miARN puede contener una o más modificaciones de secuencia, una o más modificaciones químicas o una combinación de las mismas que pueden: mejorar la estabilidad del miARN; reducir o eliminar sustancialmente la inmunoestimulación (tal como a través de la respuesta inmunitaria innata); mejorar la actividad farmacológica del miARN; conservar los efectos polidirigidos del miARN; o cualquier combinación de los mismos.

[59] Las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento, que incluyen, pero no se limitan a las de la lista de secuencias, pretenden abarcar ácidos nucleicos que contienen cualquier combinación de ARN y/o ADN natural o modificado, que incluyen, pero no se limitan a dichos ácidos nucleicos que tienen nucleobases modificadas.

A modo de ejemplo adicional y sin limitación, un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleobases "ATCGATCG" abarca cualquier compuesto oligomérico que tenga dicha secuencia de nucleobases, ya sea modificada o sin modificar, incluyendo, pero no limitados a dichos compuestos que comprenden bases de ARN, tales como aquellos que tienen la secuencia "AUCGAUCG" y aquellos que tienen algunas bases de ADN y algunas bases de ARN tales como "AUCGATCG" y compuestos oligoméricos que tienen otras bases modificadas o de origen natural. Asimismo, un transcrito de ARN con la secuencia "AUCGAUCG" abarca cualquier secuencia de ADN correspondiente tal como "ATCGATCG". Las secuencias de ácidos nucleicos en el presente documento también comprenden secuencias que comprenden al menos aproximadamente: 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia descrita.

[60] En ciertos casos, una construcción de oligonucleótidos puede comprender una primera hebra que comprende el oligonucleótido dirigido a DUX4 y una segunda hebra que comprende una secuencia complementaria de al menos una parte del oligonucleótido dirigido a DUX4. La segunda hebra puede ser complementaria de al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de la primera hebra. La segunda hebra puede ser complementaria de al menos aproximadamente: 5, 10, 15 o 20 bases contiguas de la primera hebra. Un oligonucleótido puede comprender un extremo saliente, tal como un extremo 5' o un extremo 3'. La primera hebra, la segunda hebra o una combinación de las mismas pueden comprender una o más modificaciones químicas. Al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de las bases de una primera hebra, una segunda hebra o una combinación de las mismas pueden comprender una modificación química. La primera hebra, la segunda hebra o una combinación de las mismas pueden comprender una o más modificaciones de azúcar. Al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de las bases de una primera hebra, una segunda hebra o una combinación de las mismas pueden comprender una modificación de azúcar. Una modificación de azúcar puede comprender una base glicosilada. En algunos casos, una base de un nucleótido puede estar glicosilada con un glicano. La primera hebra, la segunda hebra o una combinación de las mismas pueden comprender una combinación de bases que tienen una modificación química y una modificación de azúcar.

[61] En algunos casos, un oligonucleótido como se describe en el presente documento, tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede tener de aproximadamente 5 a

aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 80 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede tener de aproximadamente 5 a aproximadamente 200 nucleótidos de longitud.

[62] En algunos otros casos, un ARN interferente puede ser un ARN no codificante regulador (ARNnc) que comprende secuencias cortas de ARN no codificante expresadas en un genoma que regula la expresión o función de otras biomoléculas en células de mamíferos. Un ARNnc tiene generalmente < 200 nucleótidos de longitud y puede ser monocatenario o bicatenario y puede formar estructuras secundarias o terciarias no lineales. Un ARNnc puede comprender ARN interferente pequeño (ARNip), microARN (miARN), ARN nuclear pequeño (ARNnp), ARN de espliceosoma de U (U-ARN), ARN nucleolar pequeño (ARNnop), ARN que interacciona con Piwi (piARN), ARN interferente pequeño asociado a repetición (ARNipar), ARN derivado de ADNr pequeño (ARNrp), ARN pequeño derivado de ARN de transferencia (ARNpt), ARN pequeño derivado de ARN ribosómico (ARNpr), ARN pequeño derivado de ARN no codificante grande (ARNpncg) o un ARN pequeño derivado de ARN mensajero (ARNpm).

[63] Un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender ADN, ARN o una mezcla de los mismos. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender una pluralidad de nucleótidos. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un análogo de ácido nucleico artificial. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender ADN, puede comprender ADN exento de células, ADNc, ADN fetal, ADN viral o ADN materno. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un ARNhc o ARNip, un mimético de ARNnc, un ARN de horquilla corta (ARNhc), un ARNip dependiente de dicer (di-ARNip), un oligonucleótido antisentido (ASO), un gapmer, un oligonucleótido mixto (*mixmer*), ARN

bicatenarios (ARNbc), iARN monocatenario (iARNmc), ARN interferente dirigido a ADN (iARNdd), un oligonucleótido activador de ARN (aARN) o un oligonucleótido de omisión de exón. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un miARN completamente sintético. Un miARN completamente sintético es aquel que no se deriva ni se basa en un ARNnc. En cambio, un miARN completamente sintético puede basarse en un análisis de múltiples secuencias diana potenciales o puede basarse en secuencias no codificantes naturales aisladas que no son ARNnc.

Oligonucleótidos modificados

[64] En algunos casos, una segunda hebra puede comprender una base de un nucleótido químicamente modificada. En algunos casos, un subconjunto de bases de la segunda hebra pueden estar químicamente modificadas, tal como de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% de bases, de aproximadamente 1% a aproximadamente 10% de bases, de aproximadamente 1% a aproximadamente 20% de bases, de aproximadamente 1% a aproximadamente 30% de bases, de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de bases, de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% de bases, de aproximadamente 1% a aproximadamente 60% de bases, de aproximadamente 1% a aproximadamente 70% de bases, de aproximadamente 1% a aproximadamente 80% de bases, o de aproximadamente 1% a aproximadamente 90% de bases, o más. Una segunda hebra como se describe en el presente documento puede estar químicamente modificada de la misma manera descrita en el presente documento para el oligonucleótido dirigido a DUX4.

[65] Un oligonucleótido puede comprender una modificación de azúcar. Un oligonucleótido puede comprender una pluralidad de modificaciones de azúcares. Una modificación de azúcar puede comprender una glucosa o un derivado de la misma. Una modificación de azúcar puede comprender una ribosa o desoxirribosa. Una modificación de azúcar puede comprender un monosacárido, un disacárido, un trisacárido o cualquier combinación de los mismos.

[66] En algunos casos, se puede modificar un ribonucleótido o un desoxinucleótido, tal como el componente base, el componente azúcar (ribosa), el componente fosfato que forma la cadena principal del oligonucleótido dirigido a DUX4, o cualquier combinación de los mismos, mediante una modificación química como se describe en el presente documento.

[67] Un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender una modificación química. Un oligonucleótido puede comprender una pluralidad de modificaciones químicas. Un oligonucleótido puede comprender una pluralidad de

modificaciones químicas dentro de una parte de un oligonucleótido, tal como un extremo terminal. Una modificación química puede comprender un grupo metilo, un grupo flúor, un grupo metoxietilo, un grupo etilo, un grupo amida, un grupo éster, más de uno de cualquiera de estos, o cualquier combinación de los mismos. Una modificación química puede comprender un nucleótido modificado químicamente tal como guanosina, uridina, adenosina, timidina o citosina, incluyendo cualquier guanosina, uridina, adenosina, timidina o citidina de origen nativo o de origen no nativo que se haya alterado químicamente, por ejemplo mediante acetilación, metilación, hidroxilación, etc., incluyendo 1-metil-adenosina, 1-metil-guanosina, 1-metil-inosina, 2,2-dimetil-guanosina, 2,6-diaminopurina, 2'-amino-2'-desoxiadenosina, 2'-amino-2'-desoxicitidina, 2'-amino-2'-desoxiguanosina, 2'-amino-2'-desoxiuridina, 2-amino-6-cloropurina-ribósido, 2-aminopurina-ribósido, 2'-ara-adenosina, 2'-ara-citidina, 2'-ara-uridina, 2'-azido-2'-desoxiadenosina, 2'-azido-2'-desoxicitidina, 2'-azido-2'-desoxiguanosina, 2'-azido-2'-desoxiuridina, 2-cloroadenosina, 2'-fluoro-2'-desoxiadenosina, 2'-fluoro-2'-desoxicitidina, 2'-fluoro-2'-desoxiguanosina, 2'-fluoro-2'-desoxiuridina, 2'-fluorotimidina, 2-metil-adenosina, 2-metil-guanosina, 2-metil-tio-N6-isopenenil-adenosina, 2'-O-metil-2-aminoadenosina, 2'-O-metil-2'-desoxiadenosina, 2'-O-metil-2'-desoxicitidina, 2'-O-metil-2'-desoxiguanosina, 2'-O-metil-2'-desoxiuridina, 2'-O-metil-5-metiluridina, 2'-O-metilinosina, 2'-O-metilpseudouridina, 2-tiocitidina, 2-tiocitidina, 3-metil-citidina, 4-acetil-citidina, 4-tiouridina, 5-(carboxihidroximetil)-uridina, 5,6-dihidrouridina, 5-aminoalilcitidina, 5-aminoalil-desoxiuridina, 5-bromouridina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilamonometil-uracilo, 5-cloro-ara-citosina, 5-fluorouridina, 5-yodouridina, 5-metoxycarbonilmetil-uridina, 5-metoxi-uridina, 5-metil-2-tiouridina, 6-azacitidina, 6-azauridina, 6-cloro-7-desaza-guanosina, 6-cloropurina-ribósido, 6-mercapto-guanosina, 6-metil-mercaptapurina-ribósido, 7-desaza-2'-desoxi-guanosina, 7-des-aza-adenosina, 7-metil-guanosina, 8-aza-adenosina, 8-bromo-adenosina, 8-bromo-guanosina, 8-mercapto-guanosina, 8-oxoguanosina, bencimidazol-ribósido, beta-D-manosil-queosina, dihidro-uridina, inosina, N1-metiladenosina, N6-([6-aminohehexil]carbamoilmetil)-adenosina, N6-isopentenil-adenosina, N6-metil-adenosina, N7-metil-xantosina, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, puromicina, queosina, ácido uracil-5-oxiacético, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, wibutoxosina, xantosina, xilo-adenosina, o cualquier combinación de los mismos. Los expertos en la técnica conocen la preparación de dichas variantes, por ejemplo de las patentes de EE. UU. US 4,373,071, US 4,401,796, US 4,415,732, US 4,458,066, US 4,500,707, US 4,668,777, US 4,973,679, US 5,047,524, US 5,132,418, US 5,153,319, US 5,262,530 o US 5,700,642.

[68] En algunos casos un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un nucleótido químicamente modificado tal como 2-amino-6-cloropurinaribósido-5'-trifosfato, 2-aminopurina-ribósido-5'-trifosfato, 2-aminoadenosina-5'-trifosfato, 2'-amino-2'-desoxicitidina-trifosfato, 2-tiocitidina-5'-trifosfato, 2-tiouridina-5'-trifosfato, 2'-fluorotimidina-5'-trifosfato, 2'-O-metil-inosina-5'-trifosfato, 4-tiouridina-5'-trifosfato, 5-aminoalilcitidina-5'-trifosfato, 5-aminoaliluridina-5'-trifosfato, 5-bromocitidina-5'-trifosfato, 5-bromouridina-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-bromo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-yodocitidina-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-yodouridina-5'-trifosfato, 5-yodo-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 5-metilcitidina-5'-trifosfato, 5-metiluridina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxicitidina-5'-trifosfato, 5-propinil-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato, 6-azacitidina-5'-trifosfato, 6-azauridina-5'-trifosfato, 6-cloropurinaribósido-5'-trifosfato, 7-desaza-adenosina-5'-trifosfato, 7-desazaguanosina-5'-trifosfato, 8-aza-adenosina-5'-trifosfato, 8-azidoadenosina-5'-trifosfato, bencimidazol-ribósido-5'-trifosfato, N1-metiladenosina-5'-trifosfato, N1-metilguanosina-5'-trifosfato, N6-metiladenosina-5'-trifosfato, 06-metilguanosina-5'-trifosfato, pseudouridina-5'-trifosfato, puromicina-5'-trifosfato, xantosina-5'-trifosfato, o cualquier combinación de los mismos.

[69] En algunos casos, un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un nucleótido químicamente modificado tal como ribonucleósido de piridin-4-ona, 5-aza-uridina, 2-tio-5-aza-uridina, 2-tiouridina, 4-tio-pseudouridina, 2-tio-pseudouridina, 5-hidroxiuridina, 3-metiluridina, 5-carboximetil-uridina, 1-carboximetil-pseudouridina, 5-propinil-uridina, 1-propinil-pseudouridina, 5-taurinometiluridina, 1-taurinometil-pseudouridina, 5-taurinometil-2-tio-uridina, 1-taurinometil-4-tio-uridina, 5-metil-uridina, 1-metil-pseudouridina, 4-tio-1-metil-pseudouridina, 2-tio-1-metil-pseudouridina, 1-metil-1-desaza-pseudouridina, 2-tio-1-metil-1-desaza-pseudouridina, dihidrouridina, dihidropseudouridina, 2-tio-dihidrouridina, 2-tio-dihidropseudouridina, 2-metoxiuridina, 2-metoxi-4-tio-uridina, 4-metoxi-pseudouridina, 4-metoxi-2-tio-pseudouridina, o cualquier combinación de los mismos.

[70] En algunos casos, un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4, el oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un nucleótido químicamente modificado tal como 5-aza-citidina, pseudoisocitidina, 3-metil-citidina, N4-acetilcitidina, 5-formilcitidina, N4-metilcitidina, 5-hidroximetilcitidina, 1-metil-pseudoisocitidina, pirrolo-citidina, pirrolo-pseudoisocitidina, 2-tio-citidina, 2-tio-5-metil-citidina, 4-tio-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-pseudoisocitidina, 4-tio-1-metil-1-desaza-

pseudoisocitidina, 1-metil-1-desaza-pseudoisocitidina, zebularina, 5-aza-zebularina, 5-metil-zebularina, 5-aza-2-tio-zebularina, 2-tio-zebularina, 2-metoxi-citidina, 2-metoxi-5-metil-citidina, 4-metoxi-pseudoisocitidina, 4-metoxi-1-metil-pseudoisocitidina, o cualquier combinación de los mismos.

[71] En algunos casos, un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un nucleótido químicamente modificado tal como 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 7-desaza-adenina, 7-desaza-8-aza-adenina, 7-desaza-2-aminopurina, 7-desaza-8-aza-2-aminopurina, 7-desaza-2,6-diaminopurina, 7-desaza-8-aza-2,6-diaminopurina, 1-metiladenosina, N6-metiladenosina, N6-isopenteniladenosina, N6-(cis-hidroxi-isopentenil)adenosina, 2-metiltio-N6-(cis-hidroxi-isopentenil)adenosina, N6-glicinilcarbamoiladenosina, N6-treonilcarbamoiladenosina, 2-metiltio-N6-treonilcarbamoiladenosina, N6,N6-dimetiladenosina, 7-metiladenina, 2-metiltio-adenina, 2-metoxi-adenina, o cualquier combinación de los mismos.

[72] En algunos casos, un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un nucleótido químicamente modificado tal como inosina, 1-metil-inosina, wiosina, wibutosina, 7-desaza-guanosina, 7-desaza-8-aza-guanosina, 6-tio-guanosina, 6-tio-7-desaza-guanosina, 6-tio-7-desaza-8-aza-guanosina, 7-metil-guanosina, 6-tio-7-metil-guanosina, 7-metilinosina, 6-metoxi-guanosina, 1-metilguanosina, N2-metilguanosina, N2,N2-dimetilguanosina, 8-oxo-guanosina, 7-metil-8-oxo-guanosina, 1-metil-6-tio-guanosina, N2-metil-6-tio-guanosina, N2,N2-dimetil-6-tio-guanosina, o cualquier combinación de los mismos.

[73] En algunos casos, un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un nucleótido químicamente modificado tal como 6-aza-citidina, 2-tio-citidina, alfa-tio-citidina, pseudo-isocitidina, 5-aminoalil-uridina, 5-iodo-uridina, N1-metil-pseudouridina, 5,6-dihidrouridina, alfa-tio-uridina, 4-tio-uridina, 6-aza-uridina, 5-hidroxi-uridina, desoxi-timidina, 5-metil-uridina, pirrolo-citidina, inosina, alfa-tio-guanosina, 6-metil-guanosina, 5-metil-citidina, 8-oxo-guanosina, 7-desaza-guanosina, N1-metil-adenosina, 2-amino-6-cloro-purina, N6-metil-2-amino-purina, pseudo-iso-citidina, 6-cloro-purina, N6-metil-adenosina, alfa-tio-adenosina, 8-azido-adenosina, 7-desaza-adenosina, o cualquier combinación de los mismos.

[74] En algunos casos, un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un nucleótido químicamente modificado, que puede estar químicamente modificado en la posición 2'. El oligonucleótido químicamente modificado puede comprender un sustituyente en el átomo de carbono 2', en donde el sustituyente puede

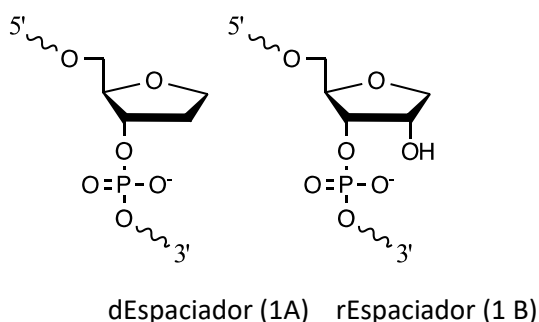
comprender un halógeno, un grupo alcoxi, un hidrógeno, un grupo ariloxi, un grupo amino o un grupo aminoalcoxi, tal como un 2'-hidrógeno (2'-desoxi), 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo, 2'-fluoro, 2'-metoxietilo, 2'-fluoro, un ácido nucleico bloqueado (LNA), o cualquier combinación de los mismos.

[75] Otra modificación química de un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 (tal como una que implica la posición 2' de un nucleótido) puede ser un nucleótido de ácido nucleico bloqueado (LNA), un nucleótido de ácido nucleico con puente de etileno (ENA), un nucleótido de (S)-etilo restringido (cEt), un ácido nucleico con puente (BNA) o cualquier combinación de los mismos. Una modificación de la cadena principal puede bloquear el azúcar del nucleótido modificado en una conformación Northern preferida. En algún caso, la presencia de este tipo de modificación en la secuencia diana del oligonucleótido dirigido a DUX4 puede permitir una unión más fuerte y más rápida de la secuencia del oligonucleótido dirigido a DUX4 en el sitio diana.

[76] En algunos casos, un oligonucleótido tal como el oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender al menos un nucleótido modificado químicamente, en donde se puede modificar la cadena principal de fosfato que se puede incorporar en el oligonucleótido dirigido a DUX4. Se pueden modificar uno o más grupos fosfato de la cadena principal, por ejemplo, sustituyendo uno o más átomos de oxígeno por un sustituyente diferente. Además, el nucleótido modificado puede incluir una sustitución completa de un resto fosfato no modificado por un fosfato modificado como se describe en el presente documento. Los ejemplos de grupos fosfato modificados pueden incluir un fosforotioato, un metilfosfonato, un fosforoselenato, un boranofosfato, un éster de boranofosfato, un hidrogenofosfonato, un fosforoamidato, un alquilfosfonato, un arilfosfonato o un fosfotriéster. El conector de fosfato también puede modificarse por sustitución de un enlace de oxígeno por nitrógeno (fosforoamidatos con puente), azufre (fosforotioatos con puente) y carbono (metilfosfonatos con puente).

[77] En algunos casos, un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender una modificación de azúcar. La modificación del azúcar puede comprender un conjugado, tal como un conector. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender uno o más grupos conectores. El oligonucleótido dirigido a DUX4 puede estar unido a un anticuerpo, una proteína, un lípido, un aptámero, una molécula pequeña, un fármaco o cualquier combinación de los mismos. Un conector puede formar un enlace covalente. El oligonucleótido dirigido a DUX4 puede unirse a uno o más oligonucleótidos, tal como un segundo oligonucleótido dirigido a DUX4 por medio

de un conector. En algunos casos, el conector puede ser un conector escindible. En algunos casos, un conector puede comprender un conector de azida. El oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender una base de un nucleótido que está glicosilado con un glicano. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender un sitio abásico, tal como un nucleótido que carece de una base orgánica. En algunos casos, el nucleótido abásico puede comprender una modificación química como se describe en el presente documento, tal como en la posición 2' de la ribosa. En algunos casos, el átomo 2' C de la ribosa puede estar sustituido con un sustituyente tal como un halógeno, un grupo alcoxi, un hidrógeno, un grupo arilo, un grupo amino o un grupo aminoalcoxi, en algunos casos a partir de 2'-hidrógeno (2'-desoxi), 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo o 2'-fluoro. En algunos casos, un nucleótido de sitio abásico puede comprender las estructuras 1A o 1B:



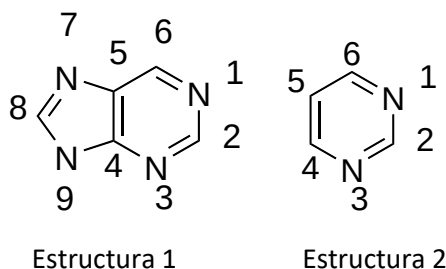
[78] En algunos casos, un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 se puede modificar por la adición de una estructura "5'-CAP". Una caperuza 5' puede ser una entidad, tal como una entidad de nucleótido modificado, que puede "tapar" el extremo 5' de un miARN maduro. Una caperuza 5' puede formarse típicamente mediante un nucleótido modificado, particularmente mediante un derivado de un nucleótido de guanina. En algunos casos, la caperuza 5' puede estar unida al extremo 5' del oligonucleótido dirigido a DUX4 por medio de un enlace 5'-5'-trifosfato. Una caperuza 5' puede estar metilada, p. ej. m⁷GpppN, en donde N puede ser el nucleótido 5' terminal del ácido nucleico que lleva la caperuza 5', tal como el extremo 5' de un ARN. Una estructura de caperuza 5' puede incluir glicerilo, resto desoxi abásico invertido (motivo), 4',5'-metilen-nucleótido, 1-(beta-D-eritrofuranosil)-nucleótido, 4'-tio-nucleótido, nucleótido carbocíclico, 1,5-anhidrohexitol-nucleótido, L-nucleótidos, alfa-nucleótido, nucleótido de base modificada, nucleótido de treopentofuranosilo, 3',4'-seco-nucleótido acíclico, 3,4-dihidroxibutil-nucleótido acíclico, 3,5-dihidroxipentil-nucleótido acíclico, motivo de nucleótido 3'-3'-invertido, motivo abásico 3'-3'-invertido, motivo de nucleótido 3'-2' invertido, motivo abásico 3'-2'-invertido, 1,4-butanodiol-fosfato, 3'-fosforamidato, hexilfosfato, aminohexil-fosfato, 3'-fosfato, 3'-

fosforotioato, fosforoditioato o motivo de metilfosfonato con puente o sin puente. En algunos casos, una estructura 5'-CAP modificada puede comprender un CAP1 (metilación de la ribosa del nucleótido adyacente de m7G), CAP2 (metilación de la ribosa del 2.º nucleótido secuencia abajo del m7G), CAP3 (metilación de la ribosa del 3.º nucleótido secuencia abajo de m7G), CAP4 (metilación de la ribosa del 4.º nucleótido secuencia abajo de m7G), ARCA (análogo de CAP anti-inverso, ARCA modificado (p. ej., ARCA modificado con fosfotioato), inosina, N1-metil-guanosina, 2'-fluoro-guanosina, 7-desaza-guanosina, 8-oxo-guanosina, 2-amino-guanosina, LNA-guanosina o 2-azido-guanosina.

[79] En algunos casos, un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4, puede incluir una modificación covalente que puede comprender añadir un grupo metilo, un grupo hidroximetilo, un átomo de carbono, un átomo de oxígeno o cualquier combinación de los mismos a una o más bases de una secuencia de ácido nucleico. En algunos casos, una modificación covalente puede comprender cambiar un estado de oxidación de una molécula asociada con una secuencia de ácido nucleico, tal como un átomo de oxígeno, o una combinación de los mismos. Una modificación covalente se puede producir en cualquier base, tal como una citosina, una timina, un uracilo, una adenina, una guanina o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, una modificación epigenética puede comprender una oxidación o una reducción. Una secuencia de ácido nucleico puede comprender una o más bases modificadas epigenéticamente. Una base modificada epigenéticamente puede comprender cualquier base, tal como una citosina, un uracilo, una timina, adenina o una guanina. Una base modificada epigenéticamente puede comprender una base metilada, una base hidroximetilada, una base formilada o una base que contiene ácido carboxílico o una sal de la misma. Una base modificada epigenéticamente puede comprender una base 5-metilada, tal como una citosina 5-metilada (5-mC). Una base modificada epigenéticamente puede comprender una base 5-hidroximetilada, tal como una citosina 5-hidroximetilada (5-hmC). Una base modificada epigenéticamente puede comprender una base 5-formilada, tal como una citosina 5-formilada (5-fC). Una base modificada epigenéticamente puede comprender una base 5-carboxilada o una sal de la misma, tal como una citosina 5-carboxilada (5-caC). En algunos casos, una base modificada epigenéticamente puede comprender una transferencia dirigida por metiltransferasa de un grupo activado (mTAG).

[80] Una base modificada epigenéticamente puede comprender una o más bases o una purina (tal como la Estructura 1) o una o más bases de una pirimidina (tal como la Estructura 2). Una modificación epigenética se puede producir en una o más de cualquier posición. Por

ejemplo, una modificación epigenética se puede producir en una o más posiciones de una purina, incluyendo las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, como se muestra en la Estructura 1. En algunos casos, una modificación epigenética se puede producir en una o más posiciones de una pirimidina, incluyendo las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, como se muestra en la Estructura 2.



[81] Una secuencia de ácido nucleico puede comprender una base modificada epigenéticamente. Una secuencia de ácido nucleico puede comprender una pluralidad de bases modificadas epigenéticamente. Una secuencia de ácido nucleico puede comprender una base modificada epigenéticamente situada dentro de un sitio CG, una isla CpG o una combinación de los mismos. Una secuencia de ácido nucleico puede comprender diferentes bases modificadas epigenéticamente, tales como una base metilada, una base hidroximetilada, una base formilada, una base que contiene ácido carboxílico o una sal de la misma, una pluralidad de cualquiera de estas, o cualquier combinación de las mismas.

[82] En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o una sal del mismo, cuando se modifica químicamente, puede tener la fórmula: Patrón guía 1, Patrón guía 2 o Patrón guía 3 como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Fórmula de la modificación química	
Patrón	Secuencia (5'-3')
1	$\{N\} * \{N\} * (n^*)_a \{N\} * \{N\}$
2	$\{N\} * \{N\} * (n^*)_b \{N\} * n^* \{N\} * \{N\}$
3	$\{N\} * \{N\} * \{N\} * (n^*)_b \{N\} * \{N\} * \{N\}$
4	$\{N\} * \{N\} * n^* \{N\} * (n^*)_c \{N\} * \{N\} * n^* n^* \{N\} * \{N\}$
5	$\langle N \rangle * \langle N \rangle * \langle N \rangle * \langle N \rangle * (n^*)_d \langle N \rangle * \langle N \rangle * \langle N \rangle * \langle N \rangle$
6	$CAP - \{N\} * \{N\} * (n^*)_a \{N\} * \{N\}$
7	$CAP - \{N\} \{N\} (n^*)_e n \{N\} \{N\}$
8	$CAP - \{N\} mp \{N\} (n^*)_e n \{N\} mp \{N\}$
9	$CAP - \{N\} * \{N\} * \{N\} * (n^*)_b \{N\} * \{N\} * \{N\}$
10	$CAP - \langle N \rangle * \langle N \rangle * \langle N \rangle * \langle N \rangle * (n^*)_d \langle N \rangle * \langle N \rangle * \langle N \rangle * \langle N \rangle$

[83] Como se muestra en la **Tabla 4**, N y n pueden ser cualquier nucleótido natural o no natural; {N} puede ser un LNA; [N] puede ser un BNA; <N> puede ser uracilo, guanina, adenina o citosina modificados con 2'-metiloxietilo; * puede ser una cadena principal modificada con fosfotionato; mp puede ser una cadena principal modificada con metilfosfonato; CAP puede ser un grupo metilo 5'-terminal (5'-OMetilo) o un grupo alquilamino tal como amino-cadena de 6 carbonos (5'-Amino C6); a puede ser 10-26; b puede ser 8-24; c puede ser 4-20; d puede ser 5-22; e puede ser 9-25.

[84] En algunos casos, un oligonucleótido tal como el oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender una modificación química de una base o un azúcar del oligonucleótido dirigido a DUX4, con respecto a una base o azúcar natural. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender más de una modificación química, tal como una pluralidad de modificaciones químicas. Una parte de las bases o una parte de los azúcares del oligonucleótido dirigido a DUX4 pueden comprender una o más modificaciones químicas. En algunos casos, aproximadamente: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de las bases o azúcares en un oligonucleótido dirigido a DUX4 pueden estar modificados químicamente.

[85] En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 se puede diseñar o modificar para aumentar la especificidad por una secuencia de ARN entre una pluralidad de secuencias de ARN. Un oligonucleótido dirigido a DUX4 se puede modificar para aumentar significativamente una especificidad por una secuencia de ARN entre una pluralidad de secuencias de ARN. La especificidad aumentada puede compararse con un oligonucleótido comparable que puede no haberse genomanipulado o puede compararse con un oligonucleótido comparable que puede haberse genomanipulado o modificado de una manera diferente. Una especificidad puede aumentarse en al menos aproximadamente: 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más en comparación con un oligonucleótido comparable. Se puede genomanipular o modificar un oligonucleótido dirigido a DUX4 para aumentar la especificidad por una primera secuencia de ARN en comparación con una segunda secuencia de ARN.

Investigación y descubrimiento de oligonucleótidos dirigidos a DUX4

[86] Para identificar variantes de DUX4 diana, la identidad entre una secuencia de referencia (secuencia de consulta, es decir, una secuencia como se describe en el presente documento) y una secuencia objeto, también denominada alineamiento de secuencias global, se puede

determinar usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990)). En algunos casos, para un aspecto particular en el que la identidad se interpreta de manera estricta, los parámetros usados en un alineamiento de aminoácidos de FASTDB, pueden incluir: Esquema de puntuación = PAM (porcentaje de mutaciones aceptadas) 0, k-tuple = 2, penalización por emparejamiento erróneo = 1, Penalización por unión = 20, Longitud del grupo de aleatorización = 0, Puntuación de corte de exclusión = 1, Tamaño de ventana = longitud de la secuencia, Penalización por hueco = 5, Penalización por tamaño de hueco = 0.05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia objeto, la que sea más corta. Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a deleciones N- o C-terminales, no debido a deleciones internas, se puede realizar una corrección manual en los resultados para tener en cuenta que el programa FASTDB no tiene en cuenta truncamientos N- y C-terminales de la secuencia objeto cuando calcula el porcentaje de identidad global. Para las secuencias objeto truncadas en los extremos N y C, respecto a la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se puede corregir calculando el número de restos de la secuencia de consulta que son laterales a los extremos N y C de la secuencia objeto, que no están emparejados/alineados con un resto objeto correspondiente, como porcentaje del total de bases de la secuencia de consulta. La determinación de si un resto está emparejado/alineado puede determinarse mediante los resultados del alineamiento de secuencias por FASTDB. Este porcentaje después se puede restar del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Este porcentaje de identidad final se puede usar para los fines de este aspecto. En algunos casos, sólo se consideran los restos de los extremos N y C de la secuencia objeto que no están emparejados/alineados con la secuencia de consulta para los fines de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad. Es decir, para esta corrección manual solo se consideran las posiciones de los restos de consulta fuera de los restos N- y C-terminales más lejanos de la secuencia objeto. Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 restos puede alinearse con una secuencia de consulta de 100 restos para determinar el porcentaje de identidad. La deleción se produce en el extremo N de la secuencia objeto y, por lo tanto, el alineamiento por FASTDB no muestra un emparejamiento/alineamiento de los primeros 10 restos en el extremo N. Los 10 restos no emparejados representan 10% de la secuencia (número de restos en los extremos N y C no emparejados/número total de restos en la secuencia de consulta), por lo que se resta 10% de la puntuación del porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. Si los 90 restos restantes se emparejaran

perfectamente, el porcentaje de identidad final sería de 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 restos con una secuencia de consulta de 100 restos. Esta vez las deleciones son deleciones internas, de modo que no hay restos en los extremos N o C de la secuencia objeto que no estén emparejados/alineados con la de consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo se corrigen manualmente las posiciones de los restos fuera de los extremos N y C-terminales de la secuencia objeto, como se muestra en el alineamiento por FASTDB, que no están emparejados/alineados con la secuencia de consulta.

[87] Con el fin de evaluar todas las posiciones de OTN diferentes, se generaron ventanas de tamaños de 15 pb, 16 pb, 17 pb, 18 pb, 19 y 20 pb con desplazamiento de 1 pb en la secuencia de referencia a lo largo del gen DUX4 chr4:190,173,774-190,185,942. Para cada ventana también se describió la secuencia de complemento inverso (antisentido) de la referencia para que pudiera usarse directamente para el diseño de OTN. Los archivos BAM de RNA-Seq de todas las muestras se fusionaron en un único archivo BAM usando la herramienta Pysamstats vl.1.2 <https://github.com/alimanfoo/pysamstats> y se usaron scripts de Python personalizados para obtener las frecuencias de bases de referencia y leer la profundidad en cada posición genómica en los archivos BAM fusionados. La cobertura media se definió como el número medio de lecturas que cubren cada base de la ventana. Se calculó una puntuación mínima de conservación para cada ventana de OTN que representa la base con la conservación más baja. Se calculó la temperatura de fusión media (T_m) para el dúplex OTN/ARN diana resultante con la herramienta Primer3 v2.4.0 R (39), con parámetros predeterminados, usando el modelo de vecino más cercano. Se comunicaron dos valores de temperatura de fusión (T_m) basados en las diferentes fórmulas de corrección de sal definidas por SantaLucia 1998 (40) y Owczarzy et al. 2004 (41). Luego se filtraron estos datos para OTN y sitios de unión de OTN en DUX4 de 15-20 pb de longitud con cobertura media de >50, una conservación mínima >85% entre individuos del estudio y una T_m media de 45-65°C. Todas las secuencias de OTN resultantes y secuencias de sitio diana de DUX4 emparejadas, todas representadas en forma de ADN, se envían como un archivo de lista de secuencias que abarca las SEQ ID NO 1-2X XXX. Se incluyeron en la descripción porque representan un recurso valioso para cualquier esfuerzo por desarrollar OTN para tratar trastornos mediados por DUX4. Estos oligonucleótidos dirigidos a DUX4 o su sal, cuando se modifican químicamente o cuando no se modifican químicamente, pueden tener al menos 90% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923- 42 115. En ciertos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede comprender al menos

aproximadamente 80% de identidad de secuencia con un oligonucleótido de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923-42 115. Por ejemplo, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede comprender al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia con un oligonucleótido de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923-42 115. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede comprender de aproximadamente 80% a 100% de identidad de secuencia con un oligonucleótido de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923-42 115. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede comprender de aproximadamente 85% a 100% de identidad de secuencia con un oligonucleótido de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923-42 115. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede comprender al menos 80% de identidad de secuencia con al menos aproximadamente 10 bases contiguas de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923-42 115. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede comprender al menos 85% de identidad de secuencia con al menos aproximadamente 10 bases contiguas de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923-42 115. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 puede comprender al menos aproximadamente: 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923-42 115, o cualquier combinación de las mismas.

[88] Además, el análisis proporcionó la capacidad de producir numerosos oligonucleótidos dirigidos a DUX4, como se muestra en la **Tabla 2** sin modificaciones químicas (SEQ ID NO: 41 923-41 982) y con modificaciones químicas (SEQ ID NO: 41 983-42 115) que están todos representados en forma de ADN. Con respecto a los oligonucleótidos dirigidos a DUX4 modificados químicamente, como se muestra en la **Tabla 2**, {N} puede ser un LNA; [N] puede ser un BNA; (N) puede ser un uracilo, guanina, adenina o citosina modificados con 2'-metiloxietilo; * puede ser una cadena principal modificada con fosfotionato; mp puede ser una cadena principal modificada con metilfosfonato; Amino C6- puede ser un amino-cadena de 6 carbonos en 5'. Además, ciertos oligonucleótidos dirigidos a DUX4, como se muestra en la **Tabla 2**, podían interactuar con múltiples subsecuencias del ARNm de DUX4 diana, como se muestra en la **Tabla 3**, también enviada en un archivo xml. Además, cualquiera de los oligonucleótidos modificados químicamente podría sintetizarse con un amino-cadena de 6 carbonos en 5' incluso si no se muestra en la tabla con retención de actividad. Los ARN dirigidos adicionales solo se dan junto a la secuencia no modificada del oligonucleótido; no se repiten para las versiones químicamente modificadas de la misma secuencia, aunque aún serían la diana de esa secuencia.

Tabla 2: Oligonucleótidos dirigidos a DUX4 que hibridan con ARN adicionales relacionados con la enfermedad

Oligo	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:	SEQ ID NO de ARN dirigidos adicionales:
AS-DX-001	GCCATCGCGGGTAGCC	41923	
AS-DX-002	TGTCGGGAGGGCCATC	23534	42274; 42482; 42169; 42566
AS-DX-003	TCCAAACGAGTCTCCG	41924	42885
AS-DX-004	GATTCTGAAACCAGAT	41925	42331; 42600
AS-DX-005	GCGGGCGCCCTGCCAC	41926	42178; 42790; 42711; 42539; 42406; 42161; 42507; 42817; 42196; 42390; 42563; 42167; 42504; 42426; 42464
AS-DX-006	TCATCCAGCAGCAGGC	41927	42694; 42734; 42493; 42284; 42481; 42636; 42352; 42705; 42147; 42235; 42775; 42219; 42752; 42633; 42758; 42166; 42559; 42733; 42651; 42413; 42581; 42479; 42827; 42595; 42365; 42260; 42230; 42866; 42144; 42725; 42143; 42678; 42362; 42172; 42206; 42173; 42884; 42832; 42141; 42480; 42590; 42151; 42168; 42236; 42321; 42248; 42586; 42767; 42485
AS-DX-007	TAGCCAGCCAGGTGTT	23789	42287; 42359; 42577; 42157; 42728; 42856; 42848; 42443; 42524; 42202
AS-DX-008	CAGCGTCGGAAGGTGG	23942	42154; 42244; 42676
AS-DX-009	TAGACAGCGTCGGAAG	23946	

AS-DX-010	ATAGGATCCACAGGGA	23981	42214; 42806; 42215; 42432; 42813; 42412; 42392; 42502
AS-DX-011	TCTATAGGATCCACAG	41928	42689
AS-DX-012	GCACTAATCATCCAGG	25364	42841; 42774; 42176; 42746
AS-DX-014	CAGCGTCGGAAGGTG	21509	42429; 42210; 42619; 42617; 42153; 42242; 42675
AS-DX-015	CCTAGACAGCGTCGGAAGGT	38051	
AS-DX-018	ATAGGATCCACAGGGAGG	30389	42760; 42492
AS-DX-019	CGGCTCTGGGATCCCCGG	41929	42310; 42826; 42744
AS-DX-020	GCAGTTCTCCGCGGAG	41930	42290; 42707; 42250; 42343; 42171; 42148
AS-DX-021	GGGGCGGAGACACGCCC	41931	42295; 42648; 42715; 42717
AS-DX-022	AGAAGGCAGGAATCCCAG	30245	42688; 42687; 42685; 42686; 42307; 42592; 42275; 42584; 42663; 42188
AS-DX-023	GCAGGAATCCCAGGCCGG	41932	42386; 42306; 42421
AS-DX-024	CTCCGCGGAGTGGAGT	41933	42289; 42149; 42878; 42783; 42661; 42423
AS-DX-025	GGAGTCTCTCACCGGGCC	41934	42308
AS-DX-026	AGAGGCCAGCGAGCTCCC	41935	42221; 42329; 42773; 42197; 42621
AS-DX-027	GGCTCTGGGATCCCCGGG	41936	42309; 42454; 42824; 42743; 42763
AS-DX-028	CAGAGAGGCCAGCGAGCT	30302	42811; 42672; 42330; 42340; 42175; 42371

AS-DX-029	GACAGCGTCGGAAGGTGG	30341	
AS-DX-030	GTA ACTCTAATCCAGGTT	30365	
AS-DX-031	GACATTCAGCCAGAAT	23921	42401; 42703; 42770; 42568; 42508; 42328; 42450
AS-DX-032	ACAAGGGCACAGAGAGGC	30310	42868; 42254; 42194; 42554
AS-DX-033	GAGCTCCCTTGCACGTCA	41937	
AS-DX-034	CCGTCCAACCCCGCGTC	41938	
AS-DX-035	CCTAAAGCTCCTCCAGCA	30205	42253; 42302; 42536
AS-DX-036	GCGAGGCGGCCTCTTCCG	41939	42297
AS-DX-037	GCCTCCAGCTCCCCCGGG	41940	42296; 42793; 42472; 42785; 42348; 42189; 42673; 42227; 42203; 42851; 42198
AS-DX-038	GGTGTCGGGAGGGCCAT	41941	42483; 42589; 42394
AS-DX-039	GCCTCAGCTGGCGTGA	23626	42797; 42666; 42427; 42357; 42660; 42653; 42858; 42531
AS-DX-040	CTGGGCCAGCCGTTCTCT	41942	42370
AS-DX-041	GGGCCAGCCGTTCTCTGG	41943	42269
AS-DX-042	GCTCCGGAATGCCGAT	41944	42538; 42548
AS-DX-043	CAATTTTCAGGCTTTTTCT	30435	
AS-DX-044	TGCCTACAGAAGGCTTTG	31124	

AS-DX-045	ATCTCTGCACTCATCACA	30402	42276
AS-DX-046	CTGATCACCGAAGTTCTG	41945	
AS-DX-048	CCAGGAGATGTA ACTCTA	30368	42761; 42518
AS-DX-049	GAAAGAGAGGCCACCGCC	30221	42303
AS-DX-050	GTAGCCAGCCAGGTGTTC	41946	42304; 42579; 42778; 42490
AS-DX-051	GCCCCTCCGTAGCCAGCC	41947	42305; 42265; 42762; 42231
AS-DX-052	TGCTGTCCGAGGGTGTCTG	30092	
AS-DX-053	AGGGGTGCTTCCAGCGAG	30179	42298; 42342
AS-DX-054	TTCTTCCTCGCTGAGGGG	30183	42299; 42894
AS-DX-055	CGGTATTCTTCCTCGCTG	30188	42300; 42789
AS-DX-056	TCCTCCAGCAGAGCCCGG	41948	42301; 42588; 42140; 42842; 42810; 42614
AS-DX-057	CCTGGGCCGGCTCTGGGA	41949	42311; 42540; 42545; 42513
AS-DX-058	TGCTGGTACCTGGGCCGG	41950	42312; 42350
AS-DX-059	TCTATAGGATCCACAGGG	30392	
AS-DX-060	GGGCATTTTAATATATCTCTGAACT	41951	
AS-DX-061	TATCTTCTGAACTAATCATCCA	41952	

AS-DX-062	CAGGAGATGTA ACTCTAATCCAG	41953	
AS-DX-063	CTCTCACCGGGCCTAGACCTAGAAG	41954	
AS-DX-064	TGCGCACTGCGCGCAGGTCTAGCCA	41955	
AS-DX-065	ACTGCGCGCAGGTCTAGCCAGGAAG	41956	
AS-DX-066	CGGGGTGCGCACTGCGCGCAGGTCT	41957	
AS-DX-067	TGCGCACTGCGCGCAGGTCTAGCCAGGAAG	41958	
AS-DX-068	ACTGCGCGCAGGTCTAGCCAGGAAGCGGGC	41959	
AS-DX-069	ACCCGACCCCGTCCCAACCCCGCGT	41960	
AS-DX-070	TGGGCTGGTGGAGAGGCAG	41961	42521; 42185; 42246; 42313; 42765; 42186; 42658; 42434; 42505; 42501; 42551; 42478; 42320; 42821; 42585; 42809; 42187; 42745; 42356; 42456; 42247; 42256; 42615; 42682; 42668; 42451; 42835; 42557; 42662; 42691; 42537; 42820; 42861; 42876; 42611; 42634; 42748; 42530
AS-DX-071	TTCCTCTCTCCATCTCTGC	41962	
AS-DX-072	TTGTCCCGGAGGAAACCGC	41963	
AS-DX-073	AATCACGCCTCCGTCGTCC	41964	
AS-DX-074	TTCCCTGCATGTTTCCGGGTGCCCCG	41965	

AS-DX-075	CTTCCCTGCATGTTTCCGG	41966	
AS-DX-076	TGTGGCTCTCGTTCATTTTC	41967	
AS-DX-077	CTCCGTGGGAGTCTTGAGTGTGCCA	41968	
AS-DX-078	TGGAACCTGAACCTCCGTGG	41969	
AS-DX-079	TGGTGGTGGTGGTGGTGGT	41970	
AS-DX-080	CACCCCTTCATGAATGGCGCC	41971	
AS-DX-081	ACAGGCTCCACCCCTTCATG	41972	
AS-DX-082	TTCCGCTCAAAGCAGGCCTC	41973	
AS-DX-083	AAAGCGATCCTTCTCAAAGGCTCGG	41974	
AS-DX-084	CCTGCGCGGGCGCCCTGCCGC	41975	
AS-DX-085	TATCTCTGAACTAATCATC	41976	
AS-DX-086	AGCGCCTGGCGGCGGAACGCAGACC	41977	
AS-DX-087	ATCTCTGCCCCGCCTTCCCTCCCGCC	41978	
AS-DX-088	AAACCAGATCTGAATCCTGGAC	41979	
AS-DX-089	TTTCTAGGAGAGGTTGCGCCTG	41980	
AS-DX-090	AGCGTCGGAAGGTGG	21508	42228; 42428; 42495; 42332; 42462; 42420; 42152; 42241; 42860; 42674

AS-DX-091	AGATCCCCTCTGCC	41981	
AS-DX-094	ACAGCGTCGGAAGGTG	23943	42620; 42618; 42677
AS-DX-095	GACAGCGTCGGAAGGT	23944	42596
AS-DX-096	AGACAGCGTCGGAAGG	23945	
AS-DX-097	CCTAGACAGCGTCGGAAGGTAG	41982	
AS-DX-098	CAGGAATCCCAGGCCG	41983	42875; 42288; 42460; 42572; 42608; 42833; 42630; 42437; 42262; 42598; 42338; 42323
AS-DX-099	CAGGAATCCCAGGCC	21371	42389; 42874; 42280; 42207; 42459; 42318; 42637; 42327; 42607; 42533; 42560; 42251; 42799; 42881; 42629; 42436; 42532; 42337; 42553; 42739; 42322; 42571; 42155
AS-DX-100	CGGCTCTGGGATCCCCGGGA	41984	42316
AS-DX-101	GGCTCTGGGATCCCCG	41985	42655; 42291; 42453; 42425; 42837; 42681; 42731; 42679; 42801; 42823; 42335; 42603; 42218; 42825; 42379; 42604; 42610; 42742; 42385; 42486
AS-DX-102	GGCTCTGGGATCCCC	41986	42654; 42282; 42520; 42452; 42836; 42680; 42730; 42461; 42510; 42587; 42800; 42822; 42334; 42580; 42602; 42258; 42529; 42474; 42270; 42264; 42351; 42766; 42764; 42399; 42377; 42609; 42622; 42718; 42484
AS-DX-104	TAGACAGCGTCGGAAGGTGG	38049	42732; 42333; 42245; 42564; 42339; 42419

AS-DX-105	GAGCTCCCTTGCACGTCAGC	41987	
AS-DX-106	AGCTCCCTTGCACGTC	23896	42447; 42830
AS-DX-107	GAGCTCCCTTGCACGT	23897	42448; 42494; 42180; 42388; 42150
AS-DX-108	GAGCTCCCTTGCACG	21469	42445; 42782; 42852; 42867; 42179; 42387; 42569; 42525; 42380; 42383
AS-DX-109	CGTAGCCAGCCAGGTGTTCC	41988	42314
AS-DX-111	TAGCCAGCCAGGTGT	21339	42565; 42854; 42279; 42819; 42528; 42358; 42719; 42326; 42818; 42403; 42576; 42794; 42628; 42156; 42407; 42416; 42727; 42366; 42798; 42855; 42871; 42641; 42325; 42415; 42888; 42847; 42164; 42408; 42142; 42205; 42638; 42526; 42442; 42729; 42523; 42201; 42575
AS-DX-112	CTTCTATAGGATCCACAGGG	38106	42594
AS-DX-113	ATGCCCAGGAAAGAATGGCA	41989	
AS-DX-114	CAAAGACAGACAGAGGTA	41990	42704; 42768; 42240; 42163; 42441
AS-DX-116	GTCCTAAAGCTCCTCCA	26770	42294; 42623; 42336; 42803; 42431; 42583; 42750
AS-DX-117	TCCTAAAGCTCCTCCAG	26769	42293; 42162; 42535; 42780; 42467; 42430; 42582; 42183; 42208
AS-DX-118	GGGATGCCTTGCATCTG	26720	42292; 42578; 42324; 42349; 42395
AS-DX-119	GAAACCAGATCTGAATC	41991	42368; 42547; 42400

AS-DX-120	GGGTCCAAACGAGTCTC	41992	42542; 42268; 42747
AS-DX-121	GCTGCAGAACTCCGG	41993	42285; 42519; 42190; 42723; 42319; 42192; 42616
AS-DX-122	TGTTCCCCGCGAAAGA	23783	42286; 42220
AS-DX-123	GTGACATATCTCTGCA	23998	42807; 42804; 42409
AS-DX-124	CATATCTCTGCACTCA	23994	42740; 42229; 42889; 42652
AS-DX-125	GACATATCTCTGCACT	23996	42373; 42487; 42139
AS-DX-126	GGGGTCCAAACGAGTC	41994	42466; 42541; 42438; 42165; 42266; 42522
AS-DX-127	TACAGGGGATATTGTG	41995	42708; 42457; 42828
AS-DX-128	AGCAGGGCGGTCTGG	41996	42814; 42211; 42515; 42701; 42381; 42422; 42642; 42497; 42665; 42839; 42639; 42859; 42720; 42831; 42690; 42433; 42702; 42375; 42272; 42781
AS-DX-129	AGCTGCCCCGGCTTG	41997	42864; 42517; 42277; 42791; 42367; 42751; 42237; 42612; 42393; 42439; 42382; 42862; 42458; 42887; 42863; 42573; 42417; 42396; 42667; 42543; 42405; 42613; 42391; 42722; 42670; 42372; 42170
AS-DX-130	CCCAGGAAAGAAAGG	41998	42659; 42815; 42281; 42212; 42769; 42374; 42599; 42354; 42880; 42632; 42700; 42200; 42886; 42656; 42753; 42857; 42488; 42759; 42625; 42273; 42344; 42816; 42204

AS-DX-131	GGTGAGCCCCGGCCGG	41999	42754; 42812; 42402; 42506; 42222; 42404; 42471; 42341; 42145; 42469; 42850; 42556; 42883; 42840; 42756; 42873; 42195; 42893; 42671
AS-DX-132	GCAGACCAGGGCGCC	42000	42435; 42278; 42411; 42792; 42749; 42591; 42397; 42737; 42199; 42721; 42193; 42347; 42870; 42346; 42552; 42424; 42500; 42364; 42259; 42146; 42624; 42779; 42473; 42263; 42738; 42360; 42355; 42626; 42503; 42414; 42217; 42475; 42890; 42605; 42845; 42555; 42834; 42440; 42788; 42376; 42879; 42697; 42249; 42786; 42261; 42849
AS-DX-133	CCTGGGCCGGCTCTG	42001	42516; 42699; 42891; 42664; 42213; 42283; 42574; 42239; 42398; 42713; 42544; 42838; 42224; 42511; 42514; 42477; 42378; 42877; 42882; 42706; 42496; 42561; 42698; 42449; 42787; 42635; 42512; 42191; 42209; 42363; 42361; 42683; 42869; 42692; 42550; 42892; 42232
AS-DX-134	AGAAGGCAGGAATCCCAGGC	37973	42315
AS-DX-135	CGGGTGCCTGGCCCTTC	42002	42772; 42795; 42509; 42796; 42468; 42865; 42716; 42606; 42418

AS-DX-136	CCAGCTCCTCCCGGGC	42003	42724; 42736; 42696; 42695; 42177; 42498; 42712; 42465; 42225; 42234; 42646; 42643; 42345; 42843; 42741; 42567; 42714; 42238; 42872; 42353; 42784; 42647; 42649; 42601; 42223; 42369; 42755; 42657; 42562; 42257; 42463; 42455; 42627; 42771; 42645; 42777; 42846; 42158; 42226; 42255; 42243; 42159; 42776; 42499; 42593; 42631; 42644; 42470; 42735; 42489; 42233; 42640; 42597; 42384; 42491; 42710; 42669; 42252; 42527; 42549; 42267; 42476; 42684; 42216; 42174; 42184; 42853; 42693; 42271; 42709
AS-DX-137	TTGTGACATATCTCTGCA	30411	42808; 42805; 42410; 42844
AS-DX-138	CTCCCTTGCACGTCA	21466	42444; 42160; 42317; 42726; 42757
AS-DX-139	GCTCCCTTGCACGTCA	23895	42446; 42181; 42829; 42570
AS-DX-140	AGCTCCCTTGCACGTCA	26881	42182
AS-DX-141	CGAGCTCCCTTGCACGTCAG	42004	
AS-DX-142	AAGCGATCCTTCTCAA	42005	42650; 42546; 42534; 42558; 42802
AS-DX-001-1	{G}*{C}*c*a*t*c*g*c*g*g*g*t*a*g*{C}*{C}	42006	
AS-DX-001-2	Amino C6- {G}*{C}*c*a*t*c*g*c*g*g*g*t*a*g*{C}*{C}	42007	

AS-DX-002-1	{T}*{G}*t*c*g*g*g*a*g*g*g*c*c*a*{T}*{C}	42008	
AS-DX-002-2	Amino C6- {T}{G}t*5mec*g*g*g*a*g*g*g*5mec*5mec*a*{T}{C}	42009	
AS-DX-002-3	Amino C6- {T}mp{G}t*c*g*g*g*a*g*g*g*c*c*a*{T}mp{C}	42010	
AS-DX-002-4	Amino C6- [T]*[G]*t*c*g*g*g*a*g*g*g*c*c*a*[T]*[C]	42011	
AS-DX-003-1	{T}*{C}*c*a*a*a*c*g*a*g*t*c*t*c*{C}*{G}	42012	
AS-DX-003-2	Amino C6- {T}*{C}*c*a*a*a*c*g*a*g*t*c*t*c*{C}*{G}	42013	
AS-DX-004-1	{G}*{A}*t*t*c*t*g*a*a*a*c*c*a*g*{A}*{T}	42014	
AS-DX-004-2	Amino C6- {G}*{A}*t*t*c*t*g*a*a*a*c*c*a*g*{A}*{T}	42015	
AS-DX-005-1	{G}*{C}*g*g*g*c*g*c*c*c*t*g*c*c*{A}*{C}	42016	
AS-DX-005-2	Amino C6- {G}*{C}*g*g*g*c*g*c*c*c*t*g*c*c*{A}*{C}	42017	
AS-DX-006-1	{T}*{C}*a*t*c*c*a*g*c*a*g*c*a*g*{G}*{C}	42018	
AS-DX-006-2	Amino C6- {T}*{C}*a*t*c*c*a*g*c*a*g*c*a*g*{G}*{C}	42019	
AS-DX-007-1	{T}*{A}*g*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*g*{T}*{T}	42020	
AS-DX-007-2	Amino C6- {T}*{A}*g*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*g*{T}*{T}	42021	
AS-DX-007-3	{T}*mA*{G}*c*c*a*g*c*c*a*g*g*t*{G}*mU*{T}	42022	
AS-DX-008-1	{C}*{A}*g*c*g*t*c*g*g*a*a*g*g*t*{G}*{G}	42023	

AS-DX-008-2	Amino C6- {C}*{A}*g*c*g*t*c*g*g*a*a*g*g*t*{G} *{G}	42024	
AS-DX-009-1	{T}*{A}*g*a*c*a*g*c*g*t*c*g*g*a*{A} *{G}	42025	
AS-DX-009-2	Amino C6- {T}*{A}*g*a*c*a*g*c*g*t*c*g*g*a*{A} *{G}	42026	
AS-DX-010-1	{A}*{T}*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*{G} *{A}	42027	
AS-DX-010-2	Amino C6- {A}*{T}*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*{G} *{A}	42028	
AS-DX-010-3	Amino C6- [A]*[T]*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*[G]*[A]	42029	
AS-DX-011-1	{T}*{C}*t*a*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*{A}* {G}	42030	
AS-DX-011-2	Amino C6- {T}*{C}*t*a*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*{A}* {G}	42031	
AS-DX-012-1	{G}*{C}*a*c*t*a*a*t*c*a*t*c*c*a*{G}* {G}	42032	
AS-DX-012-2	Amino C6- {G}*{C}*a*c*t*a*a*t*c*a*t*c*c*a*{G}* {G}	42033	
AS-DX-014-1	{C}*{A}*{G}*c*g*t*c*g*g*a*a*g*{G}*{ T}*{G}	42034	
AS-DX-014-2	Amino C6- {C}*{A}*{G}*c*g*t*c*g*g*a*a*g*{G}*{ T}*{G}	42035	
AS-DX-015-1	(C)*(C)*(T)*(A)*(G)*a*c*a*g*c*g*t*c*g* g*(A)*(A)*(G)*(G)*(T)	42036	
AS-DX-015-2	Amino C6- (C)*(C)*(T)*(A)*(G)*a*c*a*g*c*g*t*c*g* g*(A)*(A)*(G)*(G)*(T)	42037	
AS-DX-015-3	{C}*{C}*t*{A}*g*a*c*a*g*c*g*t*c*g*{ G}*{A}*a*g*{G}*{T}	42038	
AS-DX-018-1	{A}*{T}*{A}*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*g *{A}*{G}*{G}	42039	

AS-DX-018-2	{A}*{T}*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a*g*g*{G} *a*{G}*{G}	42040	
AS-DX-019-1	{C}*{G}*{G}*c*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c* {C}*{G}*{G}	42041	
AS-DX-021-1	{G}*{G}*{G}*g*c*g*g*a*g*a*c*a*c*g*{ C}*{C}*{C}	42042	
AS-DX-022-1	{A}*{G}*{A}*a*g*g*c*a*g*g*a*a*t*c*c* *{C}*{A}*{G}	42043	
AS-DX-023-1	{G}*{C}*{A}*g*g*a*a*t*c*c*c*a*g*g*c* *{C}*{G}*{G}	42044	
AS-DX-023-2	{G}*{C}*a*{G}*g*a*a*t*c*c*c*a*g*g*c* *c*mG*{G}	42045	
AS-DX-023-3	{G}*{C}*mA*g*g*a*a*t*c*c*c*a*g*g*c* {C}*mG*{G}	42046	
AS-DX-025-1	{G}*{G}*{A}*g*t*c*t*c*t*c*a*c*c*g*g* {G}*{C}*{C}	42047	
AS-DX-026-1	{A}*{G}*{A}*g*g*c*c*a*g*c*g*a*g*c*t* *{C}*{C}*{C}	42048	
AS-DX-027-1	{G}*{G}*{C}*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c*c* {G}*{G}*{G}	42049	
AS-DX-027-2	{G}*mG*c*{T}*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c*c* g*{G}*{G}	42050	
AS-DX-027-3	{G}*mG*{C}*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c*c* mG*mG*{G}	42051	
AS-DX-027-4	{G}{G}{C}*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*c*c*{G {G}{G}	42052	
AS-DX-028-1	{C}*{A}*{G}*a*g*a*g*g*c*c*a*g*c*g*a* *{G}*{C}*{T}	42053	
AS-DX-029-1	{G}*{A}*{C}*a*g*c*g*t*c*g*g*a*a*g*g* *{T}*{G}*{G}	42054	
AS-DX-029-2	Amino C6- {G}*{A}*{C}*a*g*5mec*g*t*5mec*g*g* a*a*g*g*{T}*{G}*{G}	42055	

AS-DX-030-1	{G}*{T}*{A}*a*c*t*c*t*a*a*t*c*c*a*g* {G}*{T}*{T}	42056	
AS-DX-031-1	{G}*mA*{C}*a*t*t*c*a*g*c*c*a*g*{A}* mA*{T}	42057	
AS-DX-032-1	{A}*{C}*{A}*a*g*g*g*c*a*c*a*g*a*g*a *{G}*{G}*{C}	42058	
AS-DX-033-1	{G}*{A}*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g* {T}*{C}*{A}	42059	
AS-DX-033-2	Amino C6- {G}*{A}*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*5mec *g*{T}*{C}*{A}	42060	
AS-DX-033-3	{G}*mA*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g* {T}*mC*{A}	42061	
AS-DX-033-4	{G}*{A}*g*{C}*{T}*c*c*c*t*t*g*c*a*c *g*t*mC*{A}	42062	
AS-DX-034-1	{C}*{C}*{G}*t*c*c*a*a*c*c*c*c*g*c*{ G}*{T}*{C}	42063	
AS-DX-035-1	{C}*{C}*{T}*a*a*a*g*c*t*c*c*t*c*c*a* {G}*{C}*{A}	42064	
AS-DX-036-1	{G}*{C}*{G}*a*g*g*c*g*g*c*c*t*c*t*t* {C}*{C}*{G}	42065	
AS-DX-037-1	{G}*{C}*{C}*t*c*c*a*g*c*t*c*c*c*c*c* {G}*{G}*{G}	42066	
AS-DX-038-1	{G}*{G}*{T}*g*t*c*g*g*g*a*g*g*g*c*{ C}*{A}*{T}	42067	
AS-DX-040-1	{C}*{T}*{G}*g*g*c*c*a*g*c*c*g*t*t*c* {T}*{C}*{T}	42068	
AS-DX-041-1	{G}*{G}*{G}*c*c*a*g*c*c*g*t*t*c*t*c* {T}*{G}*{G}	42069	
AS-DX-043-1	{C}*{A}*a*t*t*t*c*a*g*g*c*t*t*t*{T}*t* {C}*{T}	42070	
AS-DX-044-1	{T}*{G}*{C}*c*t*a*c*a*g*a*a*g*g*c*t* {T}*{T}*{G}	42071	

AS-DX-045-1	$\{A\}^*\{T\}^*c^*t^*c^*t^*g^*c^*a^*c^*t^*c^*a^*t^*\{C\}^*a^*\{C\}^*\{A\}$	42072	
AS-DX-045-2	$\{A\}^*mU^*\{C\}^*t^*c^*t^*g^*c^*a^*c^*t^*c^*a^*t^*c^*\{A\}^*mC^*\{A\}$	42073	
AS-DX-046-1	$\{C\}^*\{T\}^*g^*a^*t^*c^*a^*c^*c^*g^*a^*a^*g^*t^*\{T\}^*c^*\{T\}^*\{G\}$	42074	
AS-DX-048-1	$\{C\}^*\{C\}^*a^*g^*g^*a^*g^*a^*t^*g^*t^*a^*a^*c^*\{T\}^*c^*\{T\}^*\{A\}$	42075	
AS-DX-049-1	$\{G\}^*\{A\}^*\{A\}^*a^*g^*a^*g^*a^*g^*g^*c^*c^*a^*c^*c^*\{G\}^*\{C\}^*\{C\}$	42076	
AS-DX-050-1	$\{G\}^*\{T\}^*\{A\}^*g^*c^*c^*a^*g^*c^*c^*a^*g^*g^*t^*g^*\{T\}^*\{T\}^*\{C\}$	42077	
AS-DX-050-2	$\{G\}^*mU^*\{A\}^*g^*c^*c^*a^*g^*c^*c^*a^*g^*g^*t^*g^*\{T\}^*\{C\}$	42078	
AS-DX-050-3	$\{G\}^*mU^*a^*g^*c^*c^*a^*g^*c^*c^*a^*g^*g^*t^*mG^*t^*\{T\}^*\{C\}$	42079	
AS-DX-050-4	$\{G\}\{T\}\{A\}^*g^*c^*c^*a^*g^*c^*c^*a^*g^*g^*t^*g^*\{T\}\{T\}\{C\}$	42080	
AS-DX-051-1	$\{G\}^*\{C\}^*\{C\}^*c^*c^*t^*c^*c^*g^*t^*a^*g^*c^*c^*a^*\{G\}^*\{C\}^*\{C\}$	42081	
AS-DX-052-1	$\{T\}^*\{G\}^*\{C\}^*t^*g^*t^*c^*c^*g^*a^*g^*g^*g^*t^*g^*\{T\}^*\{C\}^*\{G\}$	42082	
AS-DX-053-1	$\{A\}^*\{G\}^*\{G\}^*g^*g^*t^*g^*c^*t^*t^*c^*c^*a^*g^*c^*\{G\}^*\{A\}^*\{G\}$	42083	
AS-DX-054-1	$\{T\}^*\{T\}^*\{C\}^*t^*t^*c^*c^*t^*c^*g^*c^*t^*g^*a^*g^*\{G\}^*\{G\}^*\{G\}$	42084	
AS-DX-055-1	$\{C\}^*\{G\}^*\{G\}^*t^*a^*t^*t^*c^*t^*t^*c^*c^*t^*c^*g^*\{C\}^*\{T\}^*\{G\}$	42085	
AS-DX-056-1	$\{T\}^*\{C\}^*\{C\}^*t^*c^*c^*a^*g^*c^*a^*g^*a^*g^*c^*c^*\{C\}^*\{G\}^*\{G\}$	42086	
AS-DX-057-1	$\{C\}^*\{C\}^*\{T\}^*g^*g^*g^*c^*c^*g^*g^*c^*t^*c^*t^*g^*\{G\}^*\{G\}^*\{A\}$	42087	

AS-DX-058-1	{T}*{G}*{C}*t*g*g*t*a*c*c*t*g*g*g*c* {C}*{G}*{G}	42088	
AS-DX-059-1	{T}*{C}*{T}*a*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a* {G}*{G}*{G}	42089	
AS-DX-059-2	{T}*{C}*t*{A}*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a* g*{G}*{G}	42090	
AS-DX-059-3	[Amino C6-]{T}*{C}*{T}*a*t*a*g*g*a*t*c*c*a*c*a* {G}*{G}*{G}	42091	
AS-DX-094-1	{A}*mC*{A}*g*c*g*t*c*g*g*a*a*g*{G} *mU*{G}	42092	
AS-DX-098-1	{C}*mA*{G}*g*a*a*t*c*c*c*a*g*g*{C} *mC*{G}	42093	
AS-DX-099-1	{C}*mA*{G}*g*a*a*t*c*c*c*a*g*{G}*m C*{C}	42094	
AS-DX-100-1	{C}*mG*g*{C}*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*{C} }*{C}*g*g*{G}*{A}	42095	
AS-DX-101-1	{G}*{G}*c*t*c*t*g*g*g*a*t*c*c*mC*m C*{G}	42096	
AS-DX-102-1	{G}*{G}*c*t*c*t*g*g*g*a*t*c*mC*mC* {C}	42097	
AS-DX-104-1	{T}{A}*g*{A}*c*a*g*c*g*t*c*g*g*a*a* {G}*{G}*t*{G}*{G}	42098	
AS-DX-105-1	{G}*mA*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g* {T}*{C}*a*{G}*{C}	42099	
AS-DX-106-1	{A}*mG*{C}*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*{G}* mU*{C}	42100	
AS-DX-106-2	{A}*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*{T}* {C}	42101	
AS-DX-107-1	{G}*mA*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*{C}* mG*{T}	42102	
AS-DX-108-1	{G}*mA*{G}*c*t*c*c*c*t*t*g*c*{A}*m C*{G}	42103	

AS-DX-109-1	$\{C\} * \{G\} * t * \{A\} * g * c * c * a * g * c * c * a * g * g * \{T\} * mG * t * t * \{C\} * \{C\}$	42104	
AS-DX-111-1	$\{T\} * mA * \{G\} * c * c * a * g * c * c * a * g * g * \{T\} * mG * \{T\}$	42105	
AS-DX-112-1	$\{C\} * \{T\} * t * c * \{T\} * \{A\} * t * a * g * g * a * t * c * c * a * c * a * \{G\} * \{G\} * \{G\}$	42106	
AS-DX-112-2	$(T) * (T) * (C) * (T) * a * t * a * g * g * a * t * c * c * a * c * a * (G) * (G) * (G) * (C)$	42107	
AS-DX-113-1	$\{A\} * \{T\} * g * c * c * c * a * g * g * a * a * a * g * a * \{A\} * mU * g * g * \{C\} * \{A\}$	42108	
AS-DX-114-1	$\{C\} * mA * \{A\} * a * g * a * c * a * g * a * c * a * g * a * \{G\} * G * \{T\} * \{A\}$	42109	
AS-DX-116-1	$\{G\} * mU * c * \{C\} * t * a * a * a * g * c * t * c * c * t * mC * \{C\} * \{A\}$	42110	
AS-DX-117-1	$t * \{C\} * c * t * a * a * a * g * c * t * c * c * t * c * \{C\} * mA * \{G\}$	42111	
AS-DX-118-1	$\{G\} * \{G\} * g * \{A\} * \{T\} * g * c * c * t * t * g * c * a * t * c * \{T\} * \{G\}$	42112	
AS-DX-119-1	$\{G\} * \{A\} * \{A\} * a * c * c * a * g * a * t * c * t * g * \{A\} * a * \{T\} * \{C\}$	42113	
AS-DX-120-1	$\{G\} * \{G\} * \{G\} * t * c * c * a * a * a * c * g * a * g * \{T\} * c * \{T\} * \{C\}$	42114	
AS-DX-121-1	$\{G\} * mC * \{T\} * g * c * a * g * a * a * a * c * t * c * \{C\} * mG * \{G\}$	42115	
AS-DX-122-1	$\{T\} * mG * \{T\} * t * c * c * c * c * g * c * g * a * a * \{A\} * \{G\} * \{A\}$	42116	
AS-DX-123-1	$\{G\} * \{T\} * \{G\} * a * c * a * t * a * t * c * t * c * t * \{G\} * \{C\} * \{A\}$	42117	
AS-DX-124-1	$\{C\} * \{A\} * mU * a * t * c * t * c * t * g * c * a * c * mU * \{C\} * \{A\}$	42118	
AS-DX-125-1	$\{G\} * \{A\} * c * a * t * a * t * c * t * c * t * g * \{C\} * a * \{C\} * \{T\}$	42119	

AS-DX-126-1	$\{G\}^*\{G\}^*\{G\}^*g^*t^*c^*c^*a^*a^*a^*c^*g^*a^*mG^* \{T\}^*\{C\}$	42120	
AS-DX-127-1	$\{T\}^*mA^*\{C\}^*a^*g^*g^*g^*g^*a^*t^*a^*t^*t^*\{G\}^*mU^*\{G\}$	42121	
AS-DX-128-1	$\{A\}^*mG^*mC^*a^*g^*g^*g^*c^*g^*g^*t^*c^*mU^*mG^*\{G\}$	42122	
AS-DX-129-1	$\{A\}^*mG^*\{C\}^*t^*g^*c^*c^*c^*g^*g^*c^*t^*mU^*\{G\}$	42123	
AS-DX-130-1	$\{C\}^*mC^*\{C\}^*a^*g^*g^*a^*a^*a^*g^*a^*a^*\{A\}^*mG^*\{G\}$	42124	
AS-DX-131-1	$\{G\}^*\{G\}^*mU^*g^*a^*g^*c^*c^*c^*g^*g^*c^*c^*\{G\}^*\{G\}$	42125	
AS-DX-132-1	$\{G\}^*\{C\}^*a^*g^*a^*c^*c^*a^*g^*g^*g^*c^*g^*\{C\}^*\{C\}$	42126	
AS-DX-133-1	$\{C\}^*\{C\}^*mU^*g^*g^*g^*c^*c^*g^*g^*c^*t^*\{C\}^*mU^*\{G\}$	42127	
AS-DX-133-2	$\{C\}^*\{C\}^*t^*g^*g^*g^*c^*c^*g^*g^*c^*t^*c^*\{T\}^*\{G\}$	42128	
AS-DX-134-1	$(A)^*(G)^*(A)^*(A)^*g^*g^*c^*a^*g^*g^*a^*a^*t^*c^*c^*c^*(A)^*(G)^*(G)^*(C)$	42129	
AS-DX-134-2	$\{A\}^*\{G\}^*\{A\}^*a^*g^*g^*c^*a^*g^*g^*a^*a^*t^*c^*c^*c^*mA^*\{G\}^*mG^*\{C\}$	42130	
AS-DX-135-1	$\{C\}^*\{G\}^*g^*g^*t^*g^*c^*c^*t^*g^*g^*c^*c^*mC^*t^*\{T\}^*\{C\}$	42131	
AS-DX-136-1	$\{C\}^*\{C\}^*a^*g^*c^*t^*c^*c^*t^*c^*c^*g^*g^*mG^*\{C\}$	42132	
AS-DX-137-1	$\{T\}^*\{T\}^*g^*t^*g^*a^*c^*a^*t^*a^*t^*c^*t^*c^*t^*\{G\}^*mC^*\{A\}$	42133	
AS-DX-138-1	$\{C\}^*mU^*\{C\}^*c^*c^*t^*t^*g^*c^*a^*c^*g^*\{T\}^*mC^*\{A\}$	42134	
AS-DX-139-1	$\{G\}^*mC\{T\}^*c^*c^*c^*t^*t^*g^*c^*a^*c^*g^*\{T\}^*mC^*\{A\}$	42135	

AS-DX-140-1	{A}*{G}*c*{T}*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*{T}*mC*{A}	42136	
AS-DX-141-1	(C)*(G)*(A)*(G)*c*t*c*c*c*t*t*g*c*a*c*g*(T)*(C)*(A)*(G)	42137	
AS-DX-142-1	{A}*mA*{G}*c*g*a*t*c*c*t*t*c*t*{C}*mA*{A}	42138	

[89] En la columna más a la derecha de la tabla 2 están los ARN que son parcialmente complementarios a los oligonucleótidos dirigidos a DUX4 citados, pero que se originan en locus genéticos diferentes. El uso de un script modificado de GGGenome (<https://gggenome.dbcls.jp/>), permite un rápido alineamiento de las secuencias de oligonucleótidos de los autores de la invención con el transcriptoma humano (Human RNA Refseq versión 205, marzo de 2021). Este script identificó todos los transcritos que son parcialmente complementarios de cada posible oligonucleótido dirigido a DUX4, que contienen no más de 4 emparejamientos erróneos, protuberancias, inserciones o deleciones, que contienen dos regiones de complementariedad de al menos 7 bases contiguas de largo, o una región de al menos 10 bases contiguas de largo. Estas interacciones también pueden tener una TM prevista de aproximadamente 40°C a aproximadamente 65°C.

[90] Para comprender qué otros transcritos pueden estar relacionados con la FSHD y ser beneficioso dirigirse además a estos, los autores de la invención reunieron una base de datos de 10 estudios con estándares rigurosos para la manipulación de muestras, perfiles transcriptómicos por micromatrices y RNAseq, e información importante del paciente. Se identificaron los genes que habitualmente estaban regulados por aumento en el músculo de FSHD frente al músculo de control entre los conjuntos de datos publicados o usando análisis propios de RNA-seq. Es interesante que las agrupaciones se alinean bien con las puntuaciones de gravedad clínica (es decir, enfermedades leves, moderadas o graves). Se obtuvieron resultados similares que respaldaban el análisis de los autores de la invención, de un análisis similar de un subconjunto de las muestras incluidas en el metaanálisis más amplio, como se muestra en la FIG 11. A partir de este análisis, se creó una base de datos de genes regulados por aumento en la FSHD manteniendo con cada gen la evidencia que respalda esta desregulación y cualquier correlación clínica asociada. A partir de esta base de datos, a continuación se realizó un análisis de enriquecimiento de la ruta usando el análisis de rutas GO (12). Las rutas reguladas por aumento superiores incluyen la respuesta

inflamatoria y otras rutas inmunorreguladas, la proliferación celular y la regulación del ciclo celular.

Los ARN dirigidos adicionales representan transcritos que están regulados por aumento o asociados de otro modo con la enfermedad y pueden ser beneficiosos para la reducción de la expresión además de DUX4.

[91] Además, se han identificado numerosas subsecuencias de ARNm de genes adicionales asociados con la FSHD. Por ejemplo, se prevé que AS-DX-007 (SEQ ID NO: 23 789) se dirija a tres co-dianas asociados con la FSHD, por ejemplo, DBET, MKI67 e IRF5. DBET es un ARN no codificante asociado con la apertura de las repeticiones D4Z4 y la expresión de DUX4 (38). MKI67 codifica la proteína Ki-67, que está regulada por aumento en el tejido muscular de la FSHD, y puede estar implicada en la inducción por DUX4 de la proliferación y el daño de células de fibras musculares. (**FIG. 12A**). IRF5 (factor regulador de interferón 5) codifica un factor de transcripción que está regulado por aumento por varias señales inflamatorias y da como resultado la expresión de varias citoquinas tales como TNF y la inducción de la respuesta de interferón intracelular (**FIG. 12B**). Las subsecuencias diana dentro de los transcritos del ARNm de estos genes (incluyendo las del propio DUX4) se proporcionan en el presente documento en la **Tabla 3** mostradas en forma de ARN.

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:
A4GNT	1	AGTGCAGGATAT GTT	42116	LINC00661	1	CAGCCGGGGGCA GCA	42494
ABCA7	1	CCTGGCTCTGCT GGAGGA	42117	LINC01275	1	TACAGTCACAT CTCCTGG	42495
ABCB1	1	TCCTCCTGCTGG ATGA	42118	LINC01602	1	CCGGAGTTTCT GCC	42496
ABCB9	1	ACCCCTGGCTGG CA	42119	LINC01605	1	GGGGATCCCAT AACC	42497
ABCB9	2	GCCTGCTGCTGG GA	42120	LINC01615	1	CTGCCTCTCCTC CATCCAA	42498
ABCD2	1	GCCTTGCTGGAT GA	42121	LINC02391	1	GCCTGTTTGGA CCCC	42499
ABHD15	1	CCCGCCGGGGCT CTCC	42122	LINC02725	1	ACACCTGGCTC CTA	42500
ABHD2	1	GGAGCCTGGTCT GC	42123	LINC02725	2	AACACCTGGCT CCTA	42501
ABTB1	1	GCCCTGCTGGAT GA	42124	LINC02802	1	GGGGCAAGGGA GCTC	42502
ACE	1	CACCGCGGAGA ATGC	42125	LINC02904	1	AACCTGGCTGG CTT	42503
ACOT6	1	ACTGACTCCGCG GAG	42126	LINGO3	1	GCGCTGGAGGA GCTGG	42504

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
ACOXL	1	ACATGAAGGGA GCTC	42127	LMF1	1	CCACCTGGCTG GCAA	42505
ACP3	1	GGCTGCTGCTGG ATGA	42128	LMX1A	1	AGGGATCCCAG AGTC	42506
ACTL10	1	CCACCTTCCGAC T	42129	LOC100507 403	1	CTCCCTCTCCAC CCCCA	42507
ACTL10	2	CACCTTCCGACT G	42130	LOC101927 533	1	TCAGCAGCTGA GGC	42508
ACTL10	3	CCACCTTCCGAC TG	42131	LOXL2	1	GGCCTGGGATT CG	42509
ADAM28	1	AGCCTGGGATTA CTG	42132	LPIN2	1	GGCCTGGGATC CCTC	42510
ADAM32	1	ACACCTGGCTTC TA	42133	LPIN2	2	TTGAGAAGGAT GCTT	42511
ADAM32	2	AACACCTGGCTT CTA	42134	LRP10	1	CAGGAGGAGCT TTAGGG	42512
ADAMTS 12	1	GCCCAGAGGAG CTGG	42135	LRP10	2	TCAGGAGGAGC TTTAGG	42513
ADAMTS 8	1	GCGCGGGAGGA GCGGG	42136	LRRC8A	1	CTGCCTCTCCA CGCACA	42514
ADAMTS L3	1	TGACGTGCAAGC GG	42137	LRRN2	1	CTCGGCATTCC GAAGC	42515
ADCY3	1	GCGGCCGGGCGC CCGC	42138	LRRN2	2	GGGGAGGGCGC CCGC	42516
ADGRA1	1	CTGGAGGAGCTT CAGA	42139	LRRN4	1	TCCCAGACCCG CCCAGG	42517
ADGRA2	1	GACCTCTGCTGT CTTTG	42140	LUZP1	1	GACTGTTTGGA CCCA	42518
ADGRD1	1	ACACCTGGCTGC TG	42141	LUZP1	2	GTGACTGTTTG GACCC	42519
ADGRD1	2	GCCTCTTTGGAC CCC	42142	LYPD1	1	CAGCCGGGGCA GCC	42520
ADGRE5	1	GCCTTCTGCTGG ATGA	42143	LZTS1	1	CAGGCCGGCCC AGA	42521
ADGRL3	1	GCGGCCGGGCGC CCGC	42144	LZTS1	2	TCCCAGGCCGG CCCAGA	42522
ADGRL3	2	GGCTGCTGCTGG AGA	42145	MAB21L4	1	TTGAGAAGGAT CCTC	42523
AFAP1L2	1	GAGGCCCTCCCG GCA	42146	MAFB	1	TATTCAGACTG GTTTC	42524
AFF3	1	CAAGCCGGGGA GCG	42147	MAN1C1	1	AACGCATTCCG GAGC	42525
AFF3	2	CCCGCGGAGAAC GC	42148	MANSC4	1	GCCCGGGAGGA GCGG	42526
AJUBA	1	GCCTGCTGCTGG ACGG	42149	MAP3K12	1	CTGGGCCGGCC CAGG	42527
ALPP	1	GCTGCTGCTGGA GA	42150	MAP3K12	2	CTGGCTCCACC AGCCCA	42528
ANGPTL6	1	GCCCGGGAGGC GCGGG	42151	MAP3K8	1	GGCGCCCTGGT TCC	42529

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:
ANKRD50	1	CGCTCGTGGCCTCTCTG	42152	MAP3K8	2	TGCCTGGGATTCTG	42530
ANKS1B	1	CCTGATGATTAGTGA	42153	MARCHF4	1	TCCTTCTGTGCCCTTGT	42531
ANKS3	1	GCGGGGAGGAGCTGG	42154	MAST3	1	CGCGCCCTGGTCCGC	42532
ANKS3	2	CTGGAGGGCGCCCGC	42155	MAST3	2	CCGGCCGGGGCCCGCC	42533
ANTXR2	1	AGTGCAAGGGA CTC	42156	MAST3	3	CAGCCTCTCCC CCAGCCCC	42534
ANTXR2	1	AGTGCAAGGGA CTC	42157	MAST4	1	TTGAGAAGGATGCTA	42535
ANXA4	1	TGACGTGCAAGAGC	42158	MBD2	1	TCCTGCTGGTG GATGA	42536
ANXA4	2	TGACGTGCAAGAGCT	42159	MCEMP1	1	GGCTGGGATTC CG	42537
APLP1	1	CTGGAGGAGCGTAGGA	42160	MCTP1	1	CAGAGCCGGCG CGG	42538
ARAP1	1	GCCCCGGAGGAGCTGC	42161	MEFV	1	ACCCTGGAGGAGCTGG	42539
ARHGEF34P	1	GTGCTCTCACCA GCCCA	42162	MEG3	1	GGGGCAGGGCG CCCAC	42540
ARHGEF35	1	ATGCTCTCACCA GCCCA	42163	MEG3	2	CCACCTTCCGAGCCTCCA	42541
ARHGEF5	1	GTGCTCTCACCA GCCCA	42164	MEGF11	1	ACTCCTGGCTGGCTG	42542
ARID3C	1	TTTGGAATTCCTG CTTCT	42165	MEGF11	2	GATGGCCCTCCCTAA	42543
ARL5C	1	CCCGGGGGGAGCGGAGC	42166	MFHAS1	1	GCCCTGGAGGAGCTGG	42544
ARSJ	1	CCGGAGTTTCTGCGGA	42167	MGAM	1	TTTCTGCTGAATGTC	42545
ASAP1	1	CAGAGCCGGCAGG	42168	MGAT1	1	CGGGCAAGGGAGCC	42546
ASB7	1	CTGGAGTTTCTGCAC	42169	MGAT1	2	TGCGGGCAAGGGAGC	42547
ASCL5	1	GGCGCCCTGGCTGA	42170	MICALL2	1	GGCCTGGGATTCTC	42548
ASF1B	1	CCCTCTCTGTGCCCTGGT	42171	MICALL2	2	CGGCCTGGGAGCCTG	42549
ASIC2	1	CCGGCCGGGGGCCGCC	42172	MINK1	1	CAAGACGGGGCAGCT	42550
ASIC2	2	GGGCGGGCGCCCGC	42173	MIR9-3HG	1	CAGCGCCGGCC CAGC	42551
ASIC2	3	GGGAGCTGCTGGCCCT	42174	MIS18A	1	ACACCTGGCTGGTTC	42552
ATG16L2	1	CTCAGGGGAGCTGGAGGC	42175	MKI67	1	AGACCTGGCTGGCTT	42553
ATL3	1	GGGGCCTGGTCTGC	42176	MKI67	2	AAGACCTGGCTGGCTT	42554

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
ATP2A3	1	GCTTCTTTCCTG GG	42177	MKI67	3	CAGTTGAAGGC ATCCC	42555
ATP8A2	1	ACACCTGGCTGC TA	42178	MKI67	4	GAAGACCTGGC TGGCTTC	42556
ATP8A2	2	CACACCTGGCTG CTA	42179	MMEL1	1	AGGGATCCCAG AGGC	42557
ATP8B2	1	CCCGGGGGGAGC GGGGC	42180	MMEL1	2	GCTGCTGCTGG TGA	42558
ATXN7L1	1	CCTTTCTGTCCT GGG	42181	MMRN2	1	CTGGAGGAGCT TTAA	42559
B3GNT3	1	ACCCTGGCTGGC CA	42182	MMRN2	2	TGGAGGAGCTT TAAC	42560
B3GNT3	2	TCCTGCTGCTGG TGA	42183	MRTFA	1	CTGGGATTCTT GCTTGT	42561
BARX1	1	GGCCTGGGATGC CCG	42184	MST1R	1	CTGCCTCTTCTC AGCCCA	42562
BCAS4	1	CTGGAGGAGCAT TAGA	42185	MTUS2	1	GCCTGCTGCTG ATTA	42563
BCL11A	1	CAGGCCGGCCCA GC	42186	MUC16	1	GGGGATCCCAC AGTC	42564
BOC	1	CACCTTCCGAAC TG	42187	MX1	1	CAGGGATCTGC TGGAGGA	42565
BTG3- AS1	1	GCAGCCGCCCTG CT	42188	MYEOV	1	ATGGCCCTCCC AACC	42566
C1orf52	1	TCTCTCTTTCCTG GG	42189	MYH10	1	GCGCTGCTGGA TGA	42567
C2CD4D- AS1	1	CGGCGCCGGCCC AGG	42190	MYO1F	1	GGGCCCTGGTC TTC	42568
C2CD4D- AS1	2	TCCCTGTGGATT CTCT	42191	MYO1F	2	CTGGGATACTG CCTTCT	42569
C9orf47	1	TCCCTGTGGATT CAT	42192	MYO3A	1	GCCCGGGAGGG GTGG	42570
CA9	1	GCCCGGGAGGCC TGG	42193	MYOCD	1	CCCTGGGTTCC TATAGAAG	42571
CACNA1I	1	GGCGCCCGGGTC TGC	42194	NCCRP1	1	GCTGCTGCTGG AGGA	42572
CADPS2	1	CGGGGATCCCCG AGCA	42195	NCOA7	1	ACCTTCCGACA CTTC	42573
CALHM3	1	GCCTGCTGCTGG CTGC	42196	NDN	1	GCCCGAGGAGC TGG	42574
CAMK1D	1	TCTTTCGCGGGG AAGA	42197	NDOR1	1	CGGCCTGGGAG TCTG	42575
CAPN5	1	GGGAGCTGCTGG CCTCA	42198	NEAT1	1	CCCTCCTTTCCT GGG	42576
CBLB	1	CCAGCCGGGGCT CCCC	42199	NEK11	1	ATCTGGTTTCA GAC	42577
CCDC115	1	GACCTGGAGGA GCTGG	42200	NEUROG2	1	GCCCGGGAGGA GCCAG	42578
CCDC160	1	CGGAGCCGGCCC GG	42201	NFATC2	1	GGGGTCCCAGA GCC	42579

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:
CCDC185	1	GCCCCGGAGGA GCTGG	42202	NFATC2	2	AGGGGTCCCAG AGCC	42580
CCDC88C	1	GCTCCGGAGGAG CTGG	42203	NHS	1	CGGGGATCCCG GAGGC	42581
CCDC88C	2	TCCGGAGGAGCT GGAGGC	42204	NIBAN2	1	GGCACCCTGGT CTGT	42582
CCNJL	1	CCACCTTCCGAG CC	42205	NINL	1	GGAGGGCCAGC ACCCG	42583
CD101	1	TGAGTGCAGAGT ATC	42206	NIPAL4	1	GGCCTGGCATT CCTG	42584
CD93	1	TCCGGCTGCTGG ATGA	42207	NIPAL4	2	GGGCCTGGCAT TCCTG	42585
CDC14B	1	GGCTGGCTCAGA GGGGC	42208	NLRC5	1	GGGGATCCCAC AGCC	42586
CDCA2	1	CAAGCCGGCCCA GC	42209	NLRC5	2	GGGGGATCCCA CAGCC	42587
CDK5R2	1	GCCCGGGCGAGC TGG	42210	NOD2	1	CTGCCTCCCAC CAGTCTA	42588
CELSR3	1	GCCAGGAGGAG CTGG	42211	NOL4L	1	CAACGGGGCAG CT	42589
CELSR3	2	GTCTGCTGCTGG ATGG	42212	NOLC1	1	GAAGCGGGGCA GCT	42590
CENATA C-DT	1	GCCTGCTGCTGA TGC	42213	NOS3	1	CAGGGCTCTGC TGGAGCA	42591
CEP170B	1	CAAGCCGGGGA CT	42214	NOS3	2	CTGCCTCTGCTC CAGCCCC	42592
CEP170B	2	GCCCGGGAGGA GCAGA	42215	NOTCH3	1	CCGACTTTCTG CAGC	42593
CFAP157	1	GAGAGCCGGCCC AGC	42216	NPIPA7	1	CACCTTCCGAG TG	42594
CFAP300	1	TACCTCTTCTGT CTTTA	42217	NPIPA7	2	CACCTTCCGAG TGT	42595
CHD5	1	CCACCTTCCGAA GCT	42218	NPIPA8	1	CACCTTCCGAG TG	42596
CHD5	2	CACCTTCCGAAG CTC	42219	NPIPA8	2	CACCTTCCGAG TGT	42597
CHD5	3	GCCCGGGAGGG GTGG	42220	NRP2	1	GGGAGCTGTGG CCTCT	42598
CHD5	4	CCACCTTCCGAA GCTC	42221	NTRK3	1	GTGAATCCCAG AGCC	42599
CHD5	5	CCACCTTCCGAA GCTCCTG	42222	NUPR2	1	AGGAGGAGCTT TACGAC	42600
CHP1P2	1	CTCCTGTCCACC AGCCCT	42223	NYNRIN	1	GGGGCCCTGGT CTGG	42601
CHRNA4	1	CTGCCTCTCCAT CACCA	42224	NYNRIN	2	GCTTTCTTTCCT GGT	42602
CHST11	1	GCCTGCTGCTGG GTA	42225	OAS3	1	GGCGCCCTGGC CGC	42603
CHST15	1	GGCTCCTGGTCT GC	42226	ODAD1	1	GCGGGAGGAGC TGG	42604

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
CHST8	1	CGCCGCGGAGA ACCGC	42227	OR13J1	1	ACACCTGGCTG TA	42605
CIITA	1	GGCTGGGATTCC TA	42228	OS9	1	GGCCTGGGATC CCTG	42606
CLIP2	1	GCCCAGGAGGA GCTGG	42229	OS9	2	GGGCTGGGAT CCCTG	42607
CMAHP	1	TGCTGGAGGAGC ATCAGG	42230	OSBPL5	1	GTCCAGGAGGA GCTGG	42608
CNDP2	1	CCCTCTCTGAGC CCTTGT	42231	OSBPL8	1	CCGTTCTTTCCT GGA	42609
CNKS3	1	GACCTGGAGGA GCTGG	42232	OTOG	1	GCCTGCTGCTG GGA	42610
CNTNAP 1	1	CTGCCTCTCCCC CATCCTA	42233	P2RX1	1	CCACCCCTCCA CCAGCCCA	42611
CNTROB	1	GCCCTGGAGGAG CTGT	42234	P3H1	1	CAGCCCGGCCC AGG	42612
COL12A1	1	GGGGATCCCAGA ACA	42235	PABPC1L	1	GCATGCTGCTG GAGA	42613
COL23A1	1	GGCGCCCTGGAC GC	42236	PAK3	1	GGCCTGGGATT TG	42614
COL23A1	2	GCCTGCTGCTGG GTGT	42237	PALS2	1	ACACCTGGCTG CTG	42615
COL4A1	1	GGGCCCTGGTCT TC	42238	PAPPA	1	CCAGACCGCCC GGT	42616
COL4A1	2	CTCCTGGGATTC CTG	42239	PAQR5	1	GCCCGGGAGGA GTGT	42617
COL5A3	1	GCCTCCCTGGTC TGC	42240	PAQR8	1	TCACCTGGCTG GCTG	42618
COL5A3	2	TGGGATCCCAGG GCC	42241	PATL2	1	CCACCGCCCTG CT	42619
COL5A3	3	GGCTGGCGAGG AGGGGC	42242	PCDHA2	1	GACCGGGAGGA GCTGT	42620
COL6A3	1	AACTCGTTTGGA CCCT	42243	PCDHA4	1	GACCGGGAGGA GCTGT	42621
COL6A3	2	GACCAGGAGGA GCTGG	42244	PCDHA5	1	GACCGGGAGGA GCTGT	42622
COL6A3	3	GAACCTCGTTTG ACCC	42245	PCDHB2	1	GACCGGGAGGA GCTGT	42623
COL6A5	1	CCAGAGAACGGT GGCAC	42246	PCDHB6	1	GACCGGGAGGA GCTGT	42624
COL8A1	1	TGGGATCCCAGG CC	42247	PCDHB6	2	TGGCGGGTCTC CGCCCC	42625
CORO1A	1	GCCAGGGAGGA GCTGG	42248	PCDHGA5	1	GCCGGAGGAGC TGG	42626
CPNE4	1	CCAGACCGCCGG CT	42249	PCED1B- AS1	1	GTGGAAGGATC GCTT	42627
CPNE9	1	CCCTCTTTCCTG GG	42250	PCOLCE2	1	GCCTGCTGCTG GCTGC	42628
CREB3L1	1	GATGCCCTCCCG AA	42251	PCSK5	1	GGAGTGCAGAG ATTG	42629

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
CRX	1	CTGGGTCCCTGC CTTCT	42252	PCSK9	1	TCCACCAGCTG AGGC	42630
CYP4F3	1	TGTGATGAGTCT GAGAT	42253	PDCD4- AS1	1	TGGGATCCCAG AACC	42631
DBET	1	CAAGCCGGGGC AGCT	42254	PDCD4- AS1	2	CTGGGATCCCA GAACC	42632
DBET	2	GGCGCCCTGGTC TGC	42255	PDK3	1	TCTTTCTTTCCT GAG	42633
DBET	3	ACACCTGGCTGG CTA	42256	PDZD4	1	GGCCTGGAGGA GCTGG	42634
DBET	4	GGCCTGGGATTC CTG	42257	PEAK3	1	GTCCCTCTCCA CCAACCCA	42635
DBET	5	CCATTCTTTCCT GGG	42258	PEG3	1	GCTTCTTTCCTG GG	42636
DBET	6	GGGGATCCCAGA GCC	42259	PFN1	1	TCACGCCAGCT GAGGT	42637
DBET	7	CAGAGCCGGCCC AGG	42260	PGR	1	ACTCCACTCCT GGAG	42638
DBET	8	GCCTGCTGCTGG ATGA	42261	PIK3R5	1	CTGCTCTCCAC CAGCTCT	42639
DBET	9	CCGGAGTTTCTG CAGC	42262	PIK3R5-DT	1	ATGGGATGCCT GCCTTCT	42640
DBET	10	TCTTTTCGCGGG AACA	42263	PIK3R6	1	CAGGCCGGCCC AGT	42641
DBET	11	AACACCTGGCTG GCTA	42264	PIRT	1	CCAGACCGCCA GCT	42642
DBET	12	CGGCCTGGGATT CCTG	42265	PKHD1	1	TAGCCAGCTGA GGC	42643
DBET	13	ACTCCACACCGC GGAG	42266	PLA2G6	1	CAGCGGGGCAG CT	42644
DBET	14	CACCGCGGAGA ACTGC	42267	PLA2G6	2	CTGCCTCTGCC CCAGCCCC	42645
DBET	15	CGGGGATCCCAG AGCC	42268	PLCB3	1	CCCCGGGAGAG CTGG	42646
DBET	16	CAGATGCAAGGC ATCCC	42269	PLEKHA6	1	CAGGTCGGGGC AGCT	42647
DBET	17	CTGGAGGAGCTT TAGGA	42270	PLEKHB2	1	CCGGCCGGGGC CCGCC	42648
DBET	18	TGGAGGAGCTTT AGGAC	42271	PLEKHD1	1	AGCTCCTGGCC TCTCTG	42649
DBET	19	GGGCGTGTCTCC GCCCC	42272	PLEKHG3	1	CCAGGGGGAGC TGGTGGC	42650
DBET	20	CCCGGGGGAGCT GGAGGC	42273	PLPP4	1	ACACCTTCCGA CACT	42651
DBET	21	CGGAAGAGGCG CCTCGC	42274	PLPP4	2	CACCTTCCGAC ACTG	42652
DBET	22	CTCGCTGGAAGC ACCCCT	42275	PLPP4	3	ACACCTTCCGA CACTG	42653
DBET	23	CCCCTCAGCGAG GAAGAA	42276	PLPP4	4	CACCTTCCGAC ACTGG	42654

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
DBET	24	CAGCGAGGAAG AATACCG	42277	PLXDC2	1	ACCTGCTGCTG GATGA	42655
DBET	25	CCGGGCTCTGCT GGAGGA	42278	PMEL	1	CGGGGATCCCG GAGCT	42656
DBET	26	TGCTGGAGGAGC TTTAGG	42279	PMEPA1	1	CGGAATCCCAG AGCC	42657
DBET	27	GGCGGTGGCCTC TCTTTC	42280	PMEPA1	1	CGGAATCCCAG AGCC	42658
DBET	28	GAACACCTGGCT GGCTAC	42281	PML	1	CTGCCTCCTCC AGCCCA	42659
DBET	29	GGCTGGCTACGG AGGGGC	42282	POLR2H	1	CCGAGCCGGCC CAGG	42660
DBET	30	CCGGCCTGGGAT TCCTGC	42283	POLR2H	2	GCCCGGGAGGG GCGGG	42661
DBET	31	CTGGGATTCTTG CCTTCT	42284	POM121L1 0P	1	CTGGGATCCTG CCTTCA	42662
DBET	32	GGCCGGTGAGA GACTCC	42285	POM121L1 P	1	CTGGGATCCTG CCTTCA	42663
DBET	33	CCCGGGGATCCC AGAGCC	42286	POM121L4 P	1	CTGGGATCCTG CCTTCA	42664
DBET	34	CCGGGGATCCCA GAGCCG	42287	POM121L8 P	1	CTGGGATCCTG CCTTCA	42665
DBET	35	TCCCAGAGCCGG CCCAGG	42288	PON1	1	CTGTGGATCCT GAGA	42666
DBET	36	CCGGCCCAGGTA CCAGCA	42289	PPAN- P2RY11	1	CCTGGCCGCCC TGCT	42667
DBET	37	CTGCCTCTCCAC CAGCCCA	42290	PPOX	1	CTGTTCCACCA GCCCA	42668
DBET	38	GGAACACCTGGC TGGCTACG	42291	PPP1R15A	1	CAGGGCCGGCC CAGG	42669
DBET	39	GCCTGGGATTCC TGCCTTCT	42292	PPP1R15A	2	GCCCAGGAGGA GCTGA	42670
DBET	40	TCCCGGGGATCC CAGAGCCG	42293	PPT2- EGFL8	1	GCTGCTGCTGG AGGA	42671
DBH-AS1	1	GGAAGTCAAGG GAG	42294	PRAMEF34 P	1	GCCCTGGAGGA GCTGC	42672
DCAKD	1	GGCCTGGGATAC CTT	42295	PRAMEF36 P	1	GCCCTGGAGGA GCTGC	42673
DDR2	1	ACTGAGTTTCTG CAGC	42296	PRDM16	1	GGCGCCCTGGG CTGC	42674
DDR2	2	GTGCCTCTCCAC CACCGA	42297	PRKCB	1	CAGAGCCGGCG CAGG	42675
DDX11	1	TCCTGTGCTGGA TGA	42298	PRKY	1	CCGGGCCGGCC CAGG	42676
DENND2 A	1	GGCCTGGGATTC TG	42299	PROK1	1	GCTCTCTTTCCT GGG	42677
DENND2 A	2	AGGCCTGGGATT CTG	42300	PROSER3	1	CCAGGCCGCCC TGCT	42678
DGKI	1	CAGTCAAGGCAT CCC	42301	PRR3	1	CCGACCGCCCT GT	42679

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
DGKQ	1	ACCCTGGCTGGC TC	42302	PRR5L	1	GTTCTGGCTGA AGTC	42680
DIPK2B	1	ACAACTGGCTGG CTT	42303	PRSS23	1	TAACCTGTCTGT CTTTG	42681
DLG2	1	GGCCTGGGATTC AG	42304	PRUNE2	1	GTCTGCTGCTG GTGA	42682
DLGAP2	1	ATTCGGCTGAAT GTC	42305	PTPN9	1	CGAGCCGGCCC CGG	42683
DLX1	1	CGGAGCTCGCGG CCTCT	42306	PTPRN2	1	CTCGCGGAGAA CGGC	42684
DLX1	2	AGCTCGCGGCCT CTTTG	42307	PYHIN1	1	CACAATATCCC CTGTG	42685
DLX4	1	ATCTGGTTTCAG AAC	42308	RAB31	1	GCCCGGGAGGA GCCGG	42686
DNAAF11	1	CCACCTTCCGTC CT	42309	RAB37	1	ACCAGGGAGGA GCTGG	42687
DNAH1	1	CCACCTTCAAGC TGTCTT	42310	RAB39A	1	GGGCGGGCGCC CGC	42688
DNAH10	1	GGGGATCCCAGG GCC	42311	RAPGEF4	1	GTCCGGGAGGA GCGGG	42689
DNAH10	2	TGGGGATCCCAG GGCC	42312	RASAL3	1	CGGGCCGGCCC AGG	42690
DNAH14	1	TGGAGGAGCTTT AAAC	42313	RASAL3	2	GCGCTGGAGGA GCTGG	42691
DNAH2	1	CGCCTGGGATTC TG	42314	RASGRP2	1	GGGCGTGCCCG CCCC	42692
DNAH2	1	CGCCTGGGATTC TG	42315	RASSF1	1	GAAGGGCCGCA CCCC	42693
DNAH2	2	CCACACCTACGC TGTCTA	42316	RASSF1	2	GTGCGTGTCCC CGCCCC	42694
DOCK11	1	AGCTCACTGGCC TCTCAG	42317	RBP1	1	GGCGGTCCCAG AGCC	42695
DPF1	1	CCGGCCGGGGCT CAGC	42318	RCVRN	1	CCACCTGGCTG GCTG	42696
DPP9-AS1	1	CTCGCTGGAAGC CCCCT	42319	RELB	1	CCAGACCGCCG GCT	42697
DSCAML 1	1	CACCGCGGAGA ACGC	42320	RELL2	1	GGCGCCCTGGC CCGC	42698
DZIP1L	1	TCTTCCTTTCCTG GG	42321	RGPD6	1	CAAGCCGGGGA GCG	42699
ECEL1	1	GCCTGGAGGAGC TGG	42322	RGS11	1	CCTGAGTTTCT GCGGC	42700
EDNRB	1	CGCGCCCTGGTT GC	42323	RHCG	1	GCCCAGAGGAG CTGG	42701
EFCC1	1	GGCGCCCTGGCT GC	42324	RHPN2	1	ACCTGCTGCTG GAGA	42702
EFCC1	2	CCTGGGGGAGCT GGAGGC	42325	RIMS4	1	TGCATGCAAGG GAG	42703
EGFL6	1	CAGTGCAAGGCA TCAC	42326	RIPK4	1	AGACCTGGCTG GCCA	42704

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:
EGR1	1	CCGGCCCAGGTC AGCA	42327	RIPK4	2	AAGACCTGGCT GGCCA	42705
ELF3	1	GGGGATCCCAAG CA	42328	RNASE10	1	AACCTGGCTGG CCA	42706
ENC1	1	GCTGCTGCTGGA GA	42329	RNF212	1	GGCGGTCCCAG AGCC	42707
ENOX1	1	GCCCGGGAGGA GCGG	42330	RNF212	2	CGGCGGTCCCA GAGCC	42708
EPHA2	1	CCTTGCTTTCCT GGG	42331	RPS2P32	1	CCACCTTGAT GCTGTCTC	42709
EPHB4	1	GGCGCCCTGGAC TCC	42332	RTEL1	1	GCTGCTGCTGG AGA	42710
EPHB4	2	CTCCCTCCACCA GCTCA	42333	RTEL1- TNFRSF6B	1	GCTGCTGCTGG AGA	42711
EPSTI1	1	TCCGCCAGCTGA AGC	42334	RTN1	1	GCCCTGAGGAG CTGG	42712
ERICH3	1	ACACCTGGCTGG GTA	42335	RTN4RL2	1	GCCCTGGAGGA GCTGG	42713
ERICH3	2	AACACCTGGCTG GGTA	42336	RUSC1	1	GGACCCTGGTC TGC	42714
ESPN	1	GGCGCCCTGGCA GC	42337	S1PR5	1	TGCGCCTGGTC TGC	42715
EVC2	1	CCGGGCCGGCCC AGG	42338	SAMD3	1	GGCAGGGATTC CTG	42716
EXOC3L1	1	GCTGCTGCTGGC TGA	42339	SASH1	1	TGGTGCAGAGA TACG	42717
EXOC3L2	1	CGAGCCGGCCCG GG	42340	SBNO2	1	GCCCGAGAGGA GCTGG	42718
EZR	1	GGCGCCCTGGTT TGT	42341	SCN5A	1	CGGGGATCCAG AGCC	42719
EZR	2	GCTGCTGCTGGA TA	42342	SCN5A	2	CCCGGGGATCC AGAGCC	42720
F11R	1	CCACCTGGCTGG CA	42343	SCN5A	3	CCGGGGATCCA GAGCCC	42721
FAM171A 2	1	CCAGGCGGGGC AGCT	42344	SDC3	1	CTGGCCCCACC AGCCCA	42722
FAM205A	1	GATTCAGATGGT TTC	42345	SDK1-AS1	1	CCTGGATAATT AGTGC	42723
FAM83D	1	GCTCTGGAGGAG CTGG	42346	SDK1-AS1	2	GAGACTCTTTT GGACCA	42724
FAM83G	1	AGAAACGCTGGC CCAG	42347	SEMA4C	1	GTCCCTCTCCCC AGCCCA	42725
FANCB	1	AGCTCGCGGGCT CTCTG	42348	SEMA5B	1	GTCGCCCTGGT CTGA	42726
FAS	1	CAGGCGGGGCA GCT	42349	SERPINE1	1	TGGAGGACCTT TAGGTC	42727
FAT1	1	AGTGCAGAGATT GC	42350	SEZ6	1	CAGCGGGGCAG CT	42728
FAT2	1	CCTGCTTTCCTG GG	42351	SH3TC1	1	GCCTGCTGCTG GGA	42729

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:
FAT3	1	CCGCCGCCCTGC T	42352	SHANK1	1	TCTGTCTTTCCT GGG	42730
FAT3	2	GGCGCCCTGGTG C	42353	SHE	1	CCGGCCGGGGC CCCC	42731
FBLIM1	1	GCGGATCCCAGA GCC	42354	SHISA7	1	GCCCAGAGGAG CTGG	42732
FBLIM1	2	CAAGCCGGCCCA GC	42355	SHROOM1	1	CCGGCCGGGGT CCCC	42733
FBLIM1	3	GGCGGATCCCAG AGCC	42356	SIGLEC5	1	TGCTGCAAGGG AG	42734
FBXO24	1	CGGAAGGGAGC TC	42357	SIRPB1	1	GCCTGCTGCTG GAAA	42735
FBXO41	1	CCCGCCGCCCTG CT	42358	SKI	1	CCTCTTTCCTGG G	42736
FCGBP	1	CAAGCCGGGGC AGGT	42359	SKI	2	CCTCCCTGTGG GTCCGAT	42737
FER1L6	1	CTGCAAGGGAGC C	42360	SLA	1	GAGAGTTACAT CCCTGG	42738
FGD5	1	GCCCGGGAGGA GCTGA	42361	SLC12A3	1	GGCTGGCAGGG AGGGGC	42739
FGF2	1	CGGGGATCCCGG CC	42362	SLC18B1	1	CCCGGGGACCC AGAGTC	42740
FKBP9P1	1	CCGGCCTGATTC CTGC	42363	SLC26A8	1	TGGGATCCCAG CGCC	42741
FKBPL	1	CGTGCAAGGGGC AC	42364	SLC28A3	1	CTCCCTCCCCA CCAGCCCC	42742
FKBPL	2	ACGTGCAAGGG GCAC	42365	SLC36A1	1	GAGGATCCCAG ACCC	42743
FLG-AS1	1	GGCCTGGGATTT G	42366	SLC39A11	1	GCCTGCTGCTG ATCA	42744
FLI1	1	GGGCAGGGCGCT CGC	42367	SLC41A2	1	TACGTCTGTCT GTCTTTG	42745
FLNB	1	CAAGCCGGGGG CT	42368	SLC46A2	1	GCTTTCTTTCCT GAG	42746
FLNB	2	TCACTGTGGATC CTAA	42369	SLC7A14	1	ATTCTGGCTGA CTGTG	42747
FLRT1	1	CAACCGGGGCA GCA	42370	SLC8A2	1	TCCCGGGAGGA GCGG	42748
FOSL2	1	ATGGCCCTCCCA AGACC	42371	SLC8B1	1	TAAGGGCCAGG CCCCG	42749
FOXF1	1	GAGCTGCAAGGC ATCCC	42372	SLC9B2	1	GGGAGCTCGCT GGTCCT	42750
FRAT2	1	CAAGCCGGGGC ACG	42373	SLCO1C1	1	CCTGGATGATT TTGC	42751
FRMD8	1	GGCGCCCTGGTG TGC	42374	SMAP2	1	ACCTGCTGCTG GAGGA	42752
FRMD8	2	CAAGCCGGCCCA AG	42375	SMPD3	1	GCCGGGAGGAG CGGG	42753
GAL3ST1	1	GAGGGTCCCAGA GCC	42376	SORCS3	1	GGCCGGAGGAG CTGG	42754

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
GALNS	1	CATTCAGATTGG TTTC	42377	SORCS3	2	GAAATCTGGCT GGCTAC	42755
GANC	1	TTTCTGGCTGAA TGCC	42378	SOWAHD	1	GGCGCCCTGGG TGC	42756
GAS6- AS1	1	CCGGCCGGGGCC CC	42379	SOX17	1	CTGGAGGAGCT AAGGA	42757
GAS7	1	CCACCTGGCTGG CA	42380	SOX4	1	CCGCCGCCCTG CT	42758
GASK1A	1	CCGGCCGGGGCA CC	42381	SPATA6L	1	CTCAAGGGAGC TC	42759
GASK1B	1	CAAGCCGGGGC AGCT	42382	SPATC1	1	AGCCACTCCGC GGAG	42760
GASK1B	2	GTGGCAGGGCTC CGGC	42383	SPOCD1	1	GACCAGGAGGA GCTGG	42761
GCK	1	ACACCTGGCTGG A	42384	SPOCD1	2	CCAGGAGGAGC TGGAGGC	42762
GCKR	1	ACACCTGGCTGC A	42385	SPTBN2	1	GGCCCCCTGGTC TGC	42763
GDF11	1	TGCAGAGAATGT CAC	42386	SPTBN2	2	GAGAGCCGGCC CAGC	42764
GDF11	2	TGCAGAGAATGT CACAG	42387	SRGAP2	1	GGCGCCCTGGC TTC	42765
GFOD2	1	GGCGCCCTGGAC TCC	42388	SRP19	1	CAGCGAGGAAG AAACCT	42766
GJA1	1	TCCCTGTGTATC CTAT	42389	SSBP4	1	GGGCAGGGCGC CGGC	42767
GJA3	1	CCCTGCTGCTGG ATGG	42390	SSPOP	1	CCAGCCGGGGC AGCT	42768
GJD4	1	GCCGACCTGGTC TGC	42391	SSPOP	2	GGCCCCCTGGT CTGT	42769
GLB1	1	ATACTGGCTGGC TA	42392	SSPOP	3	CCCGGGGGAGC TGGGGC	42770
GNAI3	1	GCACCTGGCTGG CAA	42393	SSTR2	1	ACACCTGGCTT CTA	42771
GNAO1	1	CAAGCCGGGGA GCC	42394	ST20-AS1	1	GCAGGGCCAGG CCCCG	42772
GNAZ	1	CAAGGGCAGGC ACCCG	42395	STAC2	1	GAAGGGCCAGG ACCAG	42773
GNAZ	2	CCACCTTGAGCT GTCTC	42396	STARD5	1	TGACGCCAGCT GATGC	42774
GPC2	1	CCACCTCCGAG GCC	42397	STARD9	1	AGACCTGGCTG GCCA	42775
GPC6	1	TCGGCCTAGGAT TCCTGC	42398	STARD9	2	GGCCTGGGATG CTG	42776
GPR146	1	CCACCGCCCTGC T	42399	STRC	1	TGGGATCCCAG ACC	42777
GPR146	2	ACTCCACTCCGA GAG	42400	STRC	2	CTGGGATCCCA GACC	42778
GPR150	1	AGCGCCCTGGTC GGC	42401	STX2	1	GTGGAAGGATC GCTT	42779

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si-tio	Secuencia	SEQ ID NO:
GPR158	1	CGGAGATCCCAG AGAC	42402	SV2B	1	GGGAGGAGCTT AGGAC	42780
GPR160	1	GTGGAGGGCGCC CGG	42403	SYNDIG1L	1	TGCAGAGAATG TCAC	42781
GPR37	1	TCCGCCAGCTGA GC	42404	SYNDIG1L	2	TGCAGAGAATG TCACCA	42782
GPX2	1	GCCCTTCCGACG CT	42405	SYNE3	1	TCCCATGGATC CTAT	42783
GPX2	2	CCCTTCCGACGC TA	42406	SYNGAP1	1	TGCAGAGTATG TCAC	42784
GRHL1	1	CTGGGAAGCTTT AGGA	42407	SYNGAP1	2	TGCAGAGTATG TCACCA	42785
GRHL1	2	TGGGAAGCTTTA GGAC	42408	SYNGR3	1	CTGCCTCTCCA CCTGCACC	42786
GRIA1	1	TCACTGTGGATC CAT	42409	TAF5	1	CCGGGCTGCTG GAGGA	42787
H2BC8	1	CCAGACCGCCGT GCG	42410	TAL1	1	AGCCGCTGGCC TCTCTC	42788
HAL	1	CTCCCTCTCCAC CAGCGCA	42411	TAPT1-AS1	1	CCGGCCGGGGC ACC	42789
HECW2- AS1	1	AGGCCCTGGTCT GC	42412	TBC1D32	1	TCCAGTGGATC CTAT	42790
HHAT	1	GTCCTGGGATTC CTG	42413	TCAM1P	1	CCAGACCTCCC TGCT	42791
HHAT	2	TGTCCTGGGATT CCTG	42414	TCAM1P	2	CCTTCCTTTCCT GGG	42792
HIP1R	1	GACGTTTGGACC CC	42415	TCF7	1	CCTTTCTTTCCT TGG	42793
HMX1	1	CCACCCGGGGCA GCT	42416	TEAD2	1	ATGGCAGGGCG CCCC	42794
HOMER3	1	GGAGCCCTGGTC TCC	42417	TEKT4	1	GCAGCTGGCTG GCTA	42795
HOXC11	1	TCCTCTTTCTGTC TTTG	42418	TEKT4P2	1	GCAGCTGGCTG GCTA	42796
HPGD	1	AAACCTGGCTGG CA	42419	TEPSIN	1	CTTCCTCTCCAC CATCCA	42797
HPGD	2	AAAACCTGGCTG GCA	42420	TESK2	1	CTGCCTCCAC CAGACCC	42798
HRAT92	1	GGACGTGCAAG GGG	42421	TESMIN	1	CGGGATCCCAG AGCT	42799
HRAT92	2	CGTGCAAGGGGC GC	42422	TESMIN	2	CCGGGATCCCA GAGCT	42800
HRAT92	3	GGACGTGCAAG GGGC	42423	TESMIN	3	CCCCGGGATCC CAGAGCT	42801
HRAT92	4	GACGTGCAAGG GGCG	42424	TFAP2B	1	CGGGGATCCAG AGCT	42802
HRAT92	5	ACGTGCAAGGG GCGC	42425	TFAP2B	2	CCGGGGATCCA GAGCTG	42803
HS6ST2	1	CGAGCCGGCCCC GG	42426	TFR2	1	GCCTGCTGCTG GTGC	42804

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
HSF2BP	1	GTTCTGGCTGAA GTC	42427	TGFB2	1	GACAGTATCCC CTGTA	42805
HTR3C	1	CTCCACTGCACC AGCCCA	42428	TGFBR3	1	AGAGGTGCAAG GGAGC	42806
ICAM2	1	CGGGATCCCAGA GCT	42429	TGFBR3	2	GAGGTGCAAGG GAGCG	42807
ICAM2	2	CCGGGATCCCAG AGCT	42430	TGM5	1	CCAGACCGCCC AGCT	42808
ICAM2	3	CCCGGGATCCCA GAGCT	42431	TIE1	1	CCCTGCTGCTG GAGA	42809
IFFO1	1	GCCAGGAGGAG CTGG	42432	TINAGL1	1	CGGCCTGGGAT CCAG	42810
IFFO2	1	CTGCCTCTCCAC CACA	42433	TLE3	1	GGCGCCCTGGG CAGC	42811
IFI16	1	CACAATATCCCC TGTG	42434	TLNRD1	1	GTGTCTCTCCA CCAGCCCC	42812
IGFBP7	1	AAAGCCGGGGC AGCA	42435	TMEM106A	1	TGGGATCCCAG ACC	42813
IGFBPL1	1	GGCCTGGGATTC TG	42436	TMEM106A	2	CTGGGATCCCA GACC	42814
IGFBPL1	2	TGGCCTGGGATT CTG	42437	TMEM165	1	CCGAGCCGGCC CGGG	42815
IGSF10	1	GGGGATCCCAAA CC	42438	TMPRSS13	1	CCAGACCCCCT GCT	42816
IGSF3	1	CCACCTCCGCC T	42439	TNFRSF12 A	1	CCAGCCGGGGC TCGCC	42817
IGSF8	1	GCCCGGGAGGTG CTGG	42440	TNFRSF21	1	CCTGGATGATT GTGC	42818
IKZF1	1	GTGGCAGGGCGC GCCG	42441	TNKS1BP1	1	CAGGGCCTGCT GGAGGA	42819
IL1R1	1	GGCCGGGAGGA GCCGG	42442	TOR4A	1	GCCGCGAGGAG CTGG	42820
ILDR2	1	GTCTGTTTGAC CCC	42443	TPK1	1	TGCAGTGATAT GTCACAA	42821
INAVA	1	CTGGAGGAGCTG AGGA	42444	TPSD1	1	GGCCCCTGGTC TGC	42822
INKA2	1	GAAGGGCCAGG CAGCAG	42445	TRAF1	1	GCCAGGAGGAG CTGG	42823
INSRR	1	CCGCGGGGCTCA CC	42446	TRAF5	1	ACACCTGGCTG TA	42824
INSRR	2	GTCCTGGAGGAG CTGG	42447	TRAF5	2	AACACCTGGCT GTA	42825
INSYN1	1	CCGGCCGGGGCC CCC	42448	TRERF1	1	AGCACCTGGT CTGC	42826
IQGAP3	1	CCCGGTGGAGCT GGAGGA	42449	TRIM56	1	CCGGCCGGGGC TCAGC	42827
IRS2	1	GGCGCCCTGGGC GGC	42450	TRIM56	2	CCTGGTGGAGC TGGAGGC	42828
ITGA6	1	GGTGCTCCCAGA GCC	42451	TRIM62	1	CTGCAAGGGAG TC	42829

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
ITGAL	1	GGCGCCCTGGTT TTC	42452	TRIM67	1	GCCCGGGAGGC GCGGG	42830
ITGAX	1	GTCCAGGAGGA GCTGG	42453	TSPAN10	1	AGCCTGGCTGG CTA	42831
ITIH5	1	CAGAGCCGGCTC AGA	42454	TSPAN13	1	ACACCTGTCTG GCTA	42832
ITIH5	2	CTGCCTCTCCCC ACCCT	42455	TSPAN13	2	GACACCTGTCT GGCTA	42833
KANK4	1	GCTGCTGCTGGA GA	42456	TSPAN14	1	CCTTTCTTTCCC AGG	42834
KCNC3	1	GCCTGCTGCTGG ATGA	42457	TTC22	1	CCAGCCAGCTG AGGC	42835
KCNC4	1	CCCTGCTGCTGG ATGA	42458	TTC34	1	CGAGCCGCCCT GCT	42836
KCNF1	1	GAAGGCCCTCCC GGCA	42459	TTC6	1	CCACCTTCCGA GCG	42837
KCNF1	2	AAGGCCCTCCCG GCACC	42460	TTLL10- AS1	1	CAGCCTCTCCA CCTGCACA	42838
KCNG2	1	GGGAATCCCAGA GCC	42461	TUBB2A	1	CCAGCCGGGGC AGCC	42839
KCNG2	2	GCCTGCTGTGGA TGA	42462	TUBB2B	1	CCAGCCGGGGC AGCC	42840
KCNG2	3	GGGGAATCCCAG AGCC	42463	TUBBP5	1	CCAGCCGGGGC AGCC	42841
KCNJ15	1	TGTGCAGAATAT GTC	42464	TULP1	1	GAGGGCCAGGC ACCCA	42842
KCNK10	1	TCTTTCTTTCCTT GG	42465	UBXN10	1	GCTGCTGCTGG TGA	42843
KCTD1	1	GCCGGGGAGGA GCTGG	42466	UCK2	1	CTGAAGGGAGC TC	42844
KCTD1	2	GAACACCCGGCT GGCCAC	42467	UCK2	2	ACCTCTCTTGCC CTTGT	42845
KCTD15	1	GCCGGGAGGAG CGG	42468	UNC13A	1	CAGAGCCGGCC CGG	42846
KCTD15	2	CCTCCCTTGAT CCTT	42469	UNC45A	1	GGCGCCCTGGC GGC	42847
KIAA031 9	1	GCTGCTGCTGGT GA	42470	VANGL1	1	CCACCTGGCTG GCA	42848
KIAA089 5L	1	AGGCAAGGGAG CTC	42471	VAV2	1	GCCTGGAGGAG CTGG	42849
KIAA152 2	1	CCACCTTCCGAC CCC	42472	VAV3	1	CCGGCCGGGGC GCACG	42850
KIAA154 9L	1	CAGGAGCCGGCC CGGG	42473	VSTM4	1	GGCCTGGGATT CCTT	42851
KIF26A	1	GCAGCCGCCCTG CT	42474	VSTM4	2	AGGCCTGGGAT TCCTT	42852
KIF5C	1	GCCCTGGAGGAG CTGG	42475	VSTM4	3	CGCCTCTCCAC CAGCACC	42853
KLC3	1	GCCCTGAGGAGC TGG	42476	VWC2	1	CCGGCCGGCCC AGG	42854

Tabla 3:							
Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:	Nombre del gen	Si- tio	Secuencia	SEQ ID NO:
KLF16	1	GGCGCCCTGGTG C	42477	VWC2	2	ACCCCTCCGCG GAG	42855
KLF16	2	CTCCTCTCCACC ACCCCC	42478	VWF	1	GGCGCCCTGGC CAGC	42856
KLHL14	1	TCCCTGTGGACC GAT	42479	WASF2	1	CCTTCTTTCCTG GA	42857
KLK10	1	GGCCCCCTGGTC TGT	42480	WDR43	1	TGCCTGGGATT CCTG	42858
KRT86	1	GTGGCAGGGCGC CAC	42481	WNT7A	1	CAGAGCCGGCC CGA	42859
KRTAP2- 1	1	CTCCTCTCCACA GCCCCA	42482	WWC1	1	CCAGCCGGGGC TCCC	42860
LAMA4	1	CTGGCGGGGCTC ACC	42483	WWC1	2	GCCTGCTGCTG AGGA	42861
LAMA5	1	GTGGCAGGGCCA CGC	42484	WVOX	1	CGGGTCTCGTT TGGA	42862
LAMC2	1	ATTCTGGCTGAT GTG	42485	XCR1	1	CCTTTCTTTCCT AGT	42863
LCNL1	1	GGAGGGCCAGG CCCCG	42486	YEATS2	1	CAGCCGGGGCA GGT	42864
LDLR	1	TGGGATCCCAGG CC	42487	YPEL2	1	AACCTGGCTGG TA	42865
LEFTY2	1	CTGAGCCGGCCC CGG	42488	ZC3H12B	1	CGAGTGCAGAG CTATG	42866
LIMK1	1	CAGAGCCGGCCC AGC	42489	ZC3H12D	1	AGCGCCTGGTC TGC	42867
LIMK1	2	GCCCAGAGCCGG CCCAGC	42490	ZDHC8P1	1	CTGGCCGGCCC AGG	42868
LINC0031 9	1	CACAGCCGGCCC AGC	42491	ZFP14	1	CAGAGCCGGCCC AGG	42869
LINC0052 8	1	GCAGGCCGCCCT GCT	42492	ZFP69	1	GCGGCCGGGGC TCACA	42870
LINC0054 0	1	CGGGCCGGCCCA GG	42493	ZNF831	1	CCCCTCAGAGA GGAAGAA	42871

[92]

Resultados del oligonucleótido dirigido a DUX4 e interacción con el ARN diana

[93] En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal que comprende una modificación cuando entra en contacto con una secuencia de ARNm de DUX4 puede producir menor actividad de un polipéptido codificado por la secuencia de ARNm de DUX4 en comparación con entrar en contacto con una cantidad equivalente de un oligonucleótido dirigido a DUX4 que carece de la modificación por lo demás comparable con la secuencia de ARNm de DUX4. En algunos casos, la menor actividad puede ser al menos aproximadamente 1.2 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser al menos aproximadamente 1.5 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser al menos

aproximadamente 1.7 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser al menos aproximadamente 2.0 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser aproximadamente: 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser de aproximadamente 1.2 veces a aproximadamente 2.0 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser de aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 1.5 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser de aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 2.5 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser de aproximadamente 1.2 veces a aproximadamente 3.0 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser de al menos aproximadamente 1.2 veces a aproximadamente al menos 10 veces menor expresión. En algunos casos, la menor actividad puede ser al menos aproximadamente 14 veces menor. En algunos casos, la menor expresión puede ser expresión al menos aproximadamente 18 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser aproximadamente: 1.2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser de aproximadamente 1.2 veces a aproximadamente 14 veces. En algunos casos, la menor actividad puede ser de aproximadamente 1.1 veces a aproximadamente 20 veces menor. En algunos casos, la menor actividad puede ser de aproximadamente 1.2 veces a aproximadamente 30 veces menor.

- [94]** En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal, cuando entra en contacto con la secuencia de ARNm, puede producir al menos aproximadamente: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces menor expresión de un polipéptido codificado por la secuencia de ARNm, en comparación con entrar en contacto con una cantidad equivalente del oligonucleótido por lo demás comparable con la secuencia de ARNm. La menor expresión puede ser de aproximadamente 1.2 veces a aproximadamente 10 veces menor.
- [95]** En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal, cuando entra en contacto con la secuencia de ARNm, puede producir al menos aproximadamente: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 veces menor actividad de un polipéptido codificado por la secuencia de ARNm, en comparación con entrar en contacto con una cantidad equivalente del oligonucleótido por lo demás comparable con la secuencia de ARNm. La expresión menor puede ser de aproximadamente 1.2 veces a aproximadamente 10 veces menor.
- [96]** En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede comprender al menos aproximadamente una temperatura de fusión térmica prevista de 45 a 65 grados

Celsius a concentración salina y pH fisiológicos. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede unirse a la secuencia de ARN a aproximadamente 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 grados Celsius. En algunos casos, un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede unirse a la secuencia de ARN a un pH de aproximadamente 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7 o 7.8.

Sujetos

- [97] En algunos aspectos, un sujeto puede comprender un mamífero que puede recibir una composición como se describe en el presente documento que comprende un ácido nucleico dirigido a DUX4 genomanipulado (tal como en forma de un oligonucleótido) o ser tratado por un método como se describe en el presente documento. Ejemplos de tales mamíferos pueden incluir seres humanos, primates no humanos (p. ej., simios, gibones, chimpancés, orangutanes, monos, macacos y similares), animales domésticos (p. ej., perros y gatos), animales de granja (p. ej., caballos, vacas, cabras, ovejas, cerdos) y animales de experimentación (p. ej., ratón, rata, conejo, cobaya). Los mamíferos pueden tener cualquier edad o estar en cualquier etapa de desarrollo, por ejemplo un mamífero puede ser neonatal, infante, adolescente, adulto o en el útero. Los mamíferos pueden ser machos o hembras. En algunos casos, un ser humano puede tener aproximadamente: de 1 día a aproximadamente 7 días, de 1 semana a aproximadamente 5 semanas, de 1 mes a aproximadamente 12 meses, de 1 año a aproximadamente 6 años, de 5 años a aproximadamente 15 años, de 14 años a aproximadamente 30 años, de 25 años a aproximadamente 50 años, de 40 años a aproximadamente 75 años, de 70 años a aproximadamente 100 años, de 85 años a aproximadamente 110 años o de aproximadamente 100 años a aproximadamente 130 años.
- [98] En algunos casos, es posible que a un sujeto no se le haya diagnosticado previamente una enfermedad o afección. En algunos casos, se puede haber diagnosticado a un sujeto una enfermedad o afección. En algunos casos, un sujeto puede no haber recibido un diagnóstico definitivo de una enfermedad o afección. Un sujeto puede estar en riesgo de desarrollar una enfermedad o afección (tal como basada al menos en parte en una variante genética). Un sujeto puede haber recibido una prueba de diagnóstico. Una prueba de diagnóstico puede incluir un procedimiento de generación de imágenes, un análisis de hemograma, un análisis de patología tisular, un análisis de biomarcadores o cualquier combinación de los mismos.
- [99] El sujeto puede ser un paciente, tal como un paciente que está siendo tratado de una afección o una enfermedad tal como una enfermedad neuromuscular. En determinados

casos, el sujeto puede estar predispuesto a un riesgo de desarrollar una afección o una enfermedad tal como un trastorno neuromuscular. El sujeto puede estar en remisión de una afección o enfermedad, tal como un trastorno neuromuscular. El sujeto puede estar sano.

- [100] En algunos aspectos, un sujeto puede ser un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, un sujeto puede tener una enfermedad de modo que el tratamiento de la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD) puede incluir, por ejemplo, aliviar la debilidad muscular experimentada por un mamífero que sufre distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD), y/o producir la remisión o desaparición de la debilidad muscular.

Administración y tratamiento

- [101] En algunos aspectos, los oligonucleótidos dirigidos a DUX4 descritos en el presente documento pueden usarse para tratar sujetos de manera que el tratamiento dé como resultado: malestar reducido, un aumento de energía, un aumento de peso, una disminución de peso, un aumento de masa muscular, un aumento de, un aumento de la flexibilidad corporal, un aumento relacionado con la postura, un aumento de la amplitud de movimiento, cese de la miotonía, disminución del dolor muscular o cualquier combinación de los mismos.
- [102] Un sujeto que lo necesite puede recibir tratamiento para una enfermedad o afección. Un tratamiento puede ser un tratamiento previo, un tratamiento profiláctico o un tratamiento preventivo. El tratamiento puede incluir la administración al sujeto que lo necesite del oligonucleótido dirigido a DUX4, una construcción de ácido nucleico, un vector o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.
- [103] El tratamiento puede incluir la administración de un oligonucleótido dirigido a DUX-4 genomanipulado altamente conservado entre pacientes y seleccionado de las SEQ ID NO: 20 962-41 922 en el archivo de lista de secuencias XML enviado en el momento de la presentación, y/o SEQ ID NO: 41 923-42 115 como se muestra en la **Tabla 2**, o cualquier combinación de los mismos.
- [104] La administración puede incluir la aplicación directa al tejido o región del cuerpo afectada. La administración puede incluir una inyección en el parénquima, una inyección intratecal, una inyección intraventricular o una inyección intracisternal. Una composición proporcionada en el presente documento puede administrarse por cualquier método. Un método de administración puede ser por inhalación, inyección intraarterial, inyección intracerebroventricular, inyección intracisternal, inyección intramuscular, inyección intraorbital, inyección intraparenquimal, inyección intraperitoneal, inyección intraespinal,

inyección intratecal, inyección intravenosa, inyección intraventricular, inyección estereotáctica, inyección subcutánea o cualquier combinación de los mismos. La administración puede incluir administración parenteral (incluyendo intravenosa, subcutánea, intratecal, intraperitoneal, intramuscular, intravascular o infusión), administración oral, administración por inhalación, administración intraduodenal, administración rectal. La administración puede incluir administración tópica (tal como una loción, una crema, un pomada) a una superficie externa de una superficie, tal como una piel. En algunos casos, un sujeto puede administrar la composición en ausencia de supervisión. En algunos casos, un sujeto puede administrar la composición bajo la supervisión de un profesional médico (p. ej., un médico, enfermera, asistente médico, enfermero, trabajador de cuidados paliativos, etc.). En algunos casos, un profesional médico puede administrar la formulación farmacéutica. En algunos casos, el tratamiento de una enfermedad neuromuscular tal como la distrofia muscular facioescapulohumeral es empleando una composición que comprende un oligonucleótido dirigido a DUX4, un vector que comprende el oligonucleótido o una formulación farmacéutica como se describe a continuación. Además también, se puede preparar un medicamento usando un oligonucleótido dirigido a DUX4, un vector que comprende el oligonucleótido o una formulación farmacéutica como se describe a continuación. El medicamento puede usarse para el tratamiento o prevención de la distrofia muscular facioescapulohumeral.

[105] Los métodos de administración pueden incluir métodos de administración *in vivo* o *in vitro*. Los métodos pueden incluir poner en contacto una célula, tal como una célula *in vivo*, con el oligonucleótido dirigido a DUX4, la construcción de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento. Los métodos pueden incluir poner en contacto una célula, tal como una célula aislada y purificada (tal como una célula *in vitro*) con el oligonucleótido dirigido a DUX4, la construcción de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento. Los métodos pueden incluir poner en contacto un tejido, tal como un tejido *in vivo* o un tejido aislado *in vitro*, con el oligonucleótido dirigido a DUX4, una construcción de ácido nucleico, un vector o una composición farmacéutica como se describe en el presente documento.

[106] El tratamiento puede incluir más de un oligonucleótido dirigido a DUX4 administrado en una dosis única. La administración puede ser simultánea, tal como la administración de más de un oligonucleótido dirigido a DUX4 en una sola inyección o en dos inyecciones separadas al mismo tiempo. La administración puede ser secuencial, tal como la

administración de una primera dosis y una segunda dosis que pueden estar separadas por un periodo de tiempo, tal como minutos, horas, días, semanas o meses.

[107] Ciertos aspectos de la descripción se refieren a la administración de un oligonucleótido dirigido a DUX4 a una célula humana que puede ser una célula de tejido de cabeza o cuello, una célula de piel, una célula de cuello uterino, una célula de próstata, una célula madre, una célula ósea, una célula sanguínea, una célula muscular, una célula grasa, una célula nerviosa, una célula endotelial, célula de espermatozoides, célula cigoto, célula de cáncer, célula de barrera, célula secretora de hormonas, célula secretora exocrina, célula epitelial, célula oral, célula transductora sensorial, célula neuronal del sistema autónomo, célula neuronal del sistema periférico, célula neuronal del sistema nervioso central, célula secretora, célula muscular cardíaca, glóbulo blanco, célula germinal, célula nodriza, célula renal, o cualquier combinación de las mismas.

[108] Un tejido puede ser una muestra que puede estar sustancialmente sana, sustancialmente benigna o de otro modo sustancialmente exenta de una enfermedad o una afección. Un tejido puede ser un tejido extraído de un sujeto, tal como una biopsia de tejido, una resección de tejido, un aspirado (tal como un aspirado con aguja fina), un lavado de tejido, una muestra de citología, un fluido corporal o cualquier combinación de los mismos. Un tejido puede comprender células cancerosas, células tumorales, células no cancerosas o una combinación de las mismas. Un tejido puede comprender una muestra de sangre (tal como una muestra de ADN exenta de células). Un tejido puede ser una muestra que puede estar modificada genéticamente.

[109] El tratamiento puede incluir el tratamiento de una afección asociada con una enfermedad neuromuscular como la distrofia muscular facioescapulohumeral. El tratamiento puede dar como resultado la reducción del malestar, un aumento de la energía, un aumento de peso, una disminución de peso, un aumento de la masa muscular, un aumento de, un aumento de la flexibilidad corporal, un aumento relacionado con la postura, un aumento de la amplitud de movimiento, cese de la miotonía, disminución del dolor muscular o cualquier combinación de los mismos.

[110] Ciertos aspectos de la descripción se refieren a la administración de un oligonucleótido tal como un oligonucleótido dirigido a DUX4 con un vector. Se puede emplear un vector para administrar el oligonucleótido dirigido a DUX4, la construcción de ácido nucleico o cualquier combinación de los mismos. Un vector puede comprender ADN, tal como ADN bicatenario o ADN monocatenario. Un vector puede comprender ARN. En algunos casos, el ARN puede comprender una modificación de bases. El vector puede comprender un

vector recombinante. El vector puede ser un vector que está modificado a partir de un vector de origen natural. El vector puede comprender al menos una parte de un vector que no es de origen natural. En algunos casos, el vector puede comprender un vector viral, un liposoma, una nanopartícula, un exosoma, una vesícula extracelular o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, un vector viral puede comprender un vector adenoviral, un vector viral adenoasociado (AAV), un vector lentiviral, un vector retroviral, una parte de cualquiera de estos o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, un vector de nanopartícula puede comprender una nanopartícula basada en polímeros, una nanopartícula basada en aminolípidos, una nanopartícula metálica (tal como una nanopartícula basada en oro), una parte de cualquiera de estas o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, un vector puede comprender un vector de AAV. Un vector puede modificarse para incluir una proteína VP1 modificada (tal como un vector AAV modificado para incluir una proteína VP1). Un AAV puede comprender un serotipo, tal como un serotipo AAV1, un serotipo AAV2, un serotipo AAV3, un serotipo AAV4, un serotipo AAV5, un serotipo AAV6, un serotipo AAV7, un serotipo AAV8, un serotipo AAV9, un derivado de cualquiera de estos, o cualquier combinación de los mismos.

- [111] En ciertos aspectos, la administración de un oligonucleótido destinado a funcionar como un oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado es por administración liposomal. En ciertos casos, el liposoma puede ser un liposoma cargado positivamente. En ciertos casos, el liposoma puede ser un liposoma cargado negativamente. En otros casos, la administración del oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado es una administración de polímero. En otros casos, la administración del oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado es una administración mediada por dendrímero. En otros casos, la administración de un oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado es por microinyección, electroporación, ultrasonidos, pistola genética o aplicaciones hidrodinámicas. En otros casos, la administración de un oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado es por conjugación o asociación con una nanopartícula.

Formulaciones farmacéuticas

- [112] En algunos aspectos, se puede emplear una amplia variedad de formulaciones farmacéuticas para suministrar un oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado en la diana.
- [113] Una formulación farmacéutica puede comprender un excipiente, diluyente, vehículo farmacéuticamente aceptable o una combinación de los mismos.

- [114]** Un vehículo de una formulación farmacéutica puede ser, en ciertos casos, un vehículo sólido y puede comprender lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, goma arábica, estearato de magnesio, ácido esteárico y similares. En otros casos, el vehículo es un vehículo líquido y puede comprender solución salina tamponada con fosfato, jarabe, aceite, aceite de cacahuete, aceite de oliva, agua, emulsiones, un agente humectante, una solución estéril o cualquier combinación de los mismos.
- [115]** En algunos aspectos con respecto a las formulaciones farmacéuticas, una formulación farmacéutica puede comprender un diluyente farmacéuticamente aceptable. Un diluyente puede comprender, por ejemplo, agua destilada estéril, agua desionizada, solución salina fisiológica, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, un medio de crecimiento celular, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o cualquier combinación de los mismos.
- [116]** En algunos aspectos con respecto a las formulaciones farmacéuticas, una formulación farmacéutica puede comprender un excipiente. En casos relacionados con el excipiente, el excipiente puede comprender un agente de pH, un agente estabilizante, un agente de tamponamiento, un agente solubilizante o cualquier combinación de los mismos. Un excipiente puede comprender un tensioactivo, un azúcar, un aminoácido, un antioxidante, una sal, un tensioactivo no iónico, un solubilizante, un triglicérido, un alcohol o cualquier combinación de los mismos. Un excipiente puede comprender carbonato sódico, acetato, citrato, fosfato, polietilenglicol (PEG), seroalbúmina humana (HSA), sorbitol, sacarosa, trehalosa, polisorbato 80, fosfato sódico, sacarosa, fosfato disódico, manitol, polisorbato 20, histidina, citrato, albúmina, hidróxido de sodio, glicina, citrato de sodio, trehalosa, arginina, acetato sódico, acetato, HCl, edetato disódico, lecitina, glicerina, goma xantana, isoflavonas de soja, polisorbato 80, alcohol etílico, agua, teprenona o cualquier combinación de los mismos. Un excipiente puede ser un excipiente descrito en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association (1986).
- [117]** En la presente descripción pueden estar incluidas sales, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, de las composiciones descritas en el presente documento. Los compuestos o composiciones de la presente descripción que pueden tener un grupo funcional suficientemente ácido, suficientemente básico o ambos, pueden reaccionar con cualquiera de una serie de bases inorgánicas, ácidos inorgánicos o ácidos orgánicos para formar una sal. Alternativamente, las composiciones que contienen compuestos que están inherentemente cargados, tales como aquellos con nitrógeno cuaternario, pueden formar una sal con un contraión apropiado, p. ej., un haluro tal como bromuro, cloruro o fluoruro, particularmente bromuro.

- [118]** Una composición farmacéutica puede comprender un primer principio activo. El primer principio activo puede comprender un oligonucleótido dirigido a DUX4 como se describe en el presente documento. La composición farmacéutica se puede formular en forma de dosis unitaria. La composición farmacéutica puede comprender un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender un segundo, tercer o cuarto principio activo, tal como un segundo oligonucleótido dirigido a DUX4.
- [119]** En algunos casos, cuando un oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado o su sal que comprende una modificación, se almacena en un envase cerrado puesto en una habitación durante un periodo de tiempo, quedará al menos aproximadamente 80% de una cantidad inicial del oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado o su sal. En algunos casos, quedará al menos aproximadamente 70% de la cantidad inicial del oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado. En algunos casos, quedará al menos aproximadamente 90% de la cantidad inicial del oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado. En algunos casos, quedará al menos aproximadamente: 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% del oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado puede ser de al menos aproximadamente 60% a aproximadamente al menos 80%. En algunos casos, el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado puede ser de al menos aproximadamente 80% a al menos aproximadamente 99%. En algunos casos, el periodo de tiempo de almacenamiento puede ser al menos 1 mes. En algunos casos, el periodo de tiempo de almacenamiento puede ser al menos aproximadamente 3 meses. En algunos casos, el periodo de tiempo de almacenamiento puede ser al menos aproximadamente 1 año. En algunos casos, el periodo de tiempo de almacenamiento puede ser al menos aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 36, 48 o 60 meses. En algunos casos, el periodo de tiempo de almacenamiento puede ser de al menos aproximadamente 1 mes a aproximadamente al menos 1 año. En algunos casos, el periodo de tiempo de almacenamiento puede ser de al menos aproximadamente 6 meses a al menos aproximadamente 2 años. En algunos casos, el periodo de almacenamiento puede ser de al menos aproximadamente 1 mes a al menos aproximadamente 5 años.
- [120]** En algunos aspectos, se puede administrar una composición farmacéutica a un sujeto en una dosis unitaria adecuada. La composición farmacéutica puede estar en forma de dosis unitaria. En algunos casos, se puede entender que dosis unitaria se refiere a productos farmacéuticos en la forma en que se comercializan para usar, con una mezcla específica de principios activos y componentes inactivos, diluyentes o excipientes, en una configuración

particular, y distribuidos en una dosis particular que se va a administrar. En algunos casos, la dosis unitaria también puede abarcar a veces envases no reutilizables, aunque la FDA distingue entre “envase” o “dispensación” de dosis unitaria. Más de una dosis unitaria puede referirse a distintos productos farmacéuticos envasados juntos, o a un único producto farmacéutico que contiene múltiples fármacos y/o dosis. En algunos casos, la expresión dosis unitaria también puede referirse a veces a las partículas que comprenden una composición farmacéutica y a cualquier mezcla implicada. En algunos casos, los tipos de dosis unitarias pueden variar según la vía de administración para el suministro del fármaco y la(s) sustancia(s) que se suministran. En algunos aspectos, la administración puede comprender administración intravenosa, intraperitoneal, intraarterial, intertumoral, subcutánea, intramuscular, intranasal, tópica, oral o intradérmica. En algunos casos, la administración puede comprender administración por inhalación. En algunos aspectos, una pauta posológica la puede determinar el médico responsable y los factores clínicos. En algunos aspectos, una dosis para un sujeto puede depender de muchos factores, que incluyen el tamaño del sujeto, superficie corporal, edad, sexo, salud general, el compuesto que se va a administrar, el momento y la vía de administración, otros fármacos que se administran simultáneamente, o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, un intervalo de una dosis puede comprender de 0.001 a 1000 μg . En algunos aspectos, una dosis puede estar por debajo o por encima de dicho intervalo. En algunos aspectos, una pauta como administración habitual de una composición farmacéutica puede estar en un intervalo de 1 μg a 10 mg. En algunos aspectos, una pauta como administración habitual de una composición farmacéutica puede estar en un intervalo de 10^2 unidades a 10^{12} unidades por día, semana o mes. En algunos casos, una unidad puede ser un vector o un ASO. En algunos aspectos, si una pauta comprende una infusión continua, también puede estar en un intervalo de 1 μg a 10 000 mg de composición farmacéutica o polinucleótido genomanipulado o ADN que codifica el polinucleótido genomanipulado o vector que contiene o codifica el polinucleótido genomanipulado por kilogramo de peso corporal por minuto, respectivamente. En determinados casos, el intervalo es de 1 mg por kilogramo de peso corporal a 1000 mg por kilogramo de peso corporal. En algunos aspectos, el progreso se puede vigilar mediante evaluaciones periódicas.

- [121] En algunos aspectos de la descripción, cuando una composición farmacéutica es un líquido se puede administrar en una forma de dosis líquida tal como de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml, de aproximadamente 5 ml a 10 ml, de aproximadamente 15 ml a aproximadamente 20 ml, de aproximadamente 25 ml a aproximadamente 30 ml, de

aproximadamente 30 ml a aproximadamente 50 ml, de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 100 ml, de aproximadamente 100 ml a 150 ml, de aproximadamente 150 ml a aproximadamente 200 ml, de aproximadamente 200 ml a aproximadamente 250 ml, de aproximadamente 250 ml a aproximadamente 300 ml, de aproximadamente 300 ml a aproximadamente 350 ml, de aproximadamente 350 ml a aproximadamente 400 ml, de aproximadamente 400 ml a aproximadamente 450 ml, de aproximadamente 450 ml a 500 ml, de aproximadamente 500 ml a 750 ml, o de aproximadamente 750 ml a 1000 ml.

[122] En algunos aspectos, una composición descrita en el presente documento se puede administrar uno o más días a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, la administración se puede producir durante aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o aproximadamente 31 días. En algunos aspectos, la administración se puede producir durante aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o aproximadamente 24 meses. En algunos aspectos, la administración se puede producir durante aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o aproximadamente 50 o más años. En algunos casos, la administración se puede producir de por vida. En algunos aspectos, una composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede administrar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más días. En algunos casos, una composición descrita en el presente documento puede administrarse en días consecutivos o en días no consecutivos. En algunos casos, una composición descrita en el presente documento puede administrarse a un sujeto más de una vez al día. En algunos casos, una composición descrita en el presente documento puede administrarse a un sujeto: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces por día.

[123] En algunos aspectos, se describen en el presente documento métodos de uso para las composiciones como se describen en el presente documento. En algunos aspectos, una pauta posológica oral diaria puede ser de aproximadamente 0.1 miligramos por kilogramo (mg/kg) a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal total, de aproximadamente 0.2 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, o de aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. En algunos aspectos, una pauta posológica parenteral diaria puede comprender de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 000 mg/kg de peso corporal total, de aproximadamente 0.2 mg/kg a aproximadamente 5000 mg/kg, o de aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg. En algunos aspectos, una pauta posológica tópica diaria puede ser de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 500 mg. En algunos

aspectos, una pauta posológica diaria puede ser de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg por día. En algunos aspectos, una cantidad y espaciamiento óptimos de dosis individuales de una composición pueden determinarse por la naturaleza y el grado de una afección que se está tratando, una forma, vía y sitio de administración, y un sujeto particular que se está tratando, y que dichos óptimos se pueden determinar preferiblemente por un método descrito en el presente documento. En algunos aspectos, los expertos en la técnica pueden determinar un número de dosis de composiciones dadas por día durante un número definido de días usando pruebas convencionales de determinación del curso de tratamiento. En algunos aspectos, la pauta posológica la puede determinar el médico responsable y otros factores clínicos. En algunos aspectos, las dosis para cualquier sujeto pueden depender de muchos factores. En algunos aspectos, los factores que afectan a la dosificación pueden comprender el tamaño de un sujeto, superficie corporal, edad, un compuesto particular a administrar, sexo, momento y vía de administración, salud general, otros fármacos que se administran simultáneamente o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el progreso se puede vigilar mediante evaluaciones periódicas.

[124] Una formulación farmacéutica se puede administrar con una pauta posológica oral diaria que puede ser de aproximadamente 0.1 miligramo por kilogramo (mg/kg) a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal total, de aproximadamente 0.2 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, o de aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. En algunos aspectos, una pauta posológica parenteral diaria puede comprender de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 000 mg/kg de peso corporal total, de aproximadamente 0.2 mg/kg a aproximadamente 5000 mg/kg, o de aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg. En algunos aspectos, una pauta posológica tópica diaria puede ser de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 500 mg. En algunos aspectos, una pauta posológica puede ser de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg por día. En algunos aspectos, una cantidad y espaciamiento óptimos de dosis individuales de una composición pueden determinarse por la naturaleza y el grado de una afección que se está tratando, una forma, vía y sitio de administración, y un sujeto particular que se está tratando, y que dichos óptimos pueden determinarse preferiblemente por un método descrito en el presente documento. En algunos aspectos, un número de dosis de composiciones dadas por día durante un número definido de días, lo pueden determinar los expertos en la técnica usando pruebas convencionales de determinación del curso del tratamiento. En algunos aspectos, la pauta posológica la puede determinar el médico responsable y otros factores clínicos. En algunos aspectos, las dosis

para cualquier sujeto pueden depender de muchos factores. En algunos aspectos, los factores que afectan a la dosis pueden comprender el tamaño de un sujeto, superficie corporal, edad, un compuesto particular a administrar, sexo, momento y vía de administración, salud general, otros fármacos que se administran simultáneamente o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el progreso se puede vigilar mediante evaluaciones periódicas.

- [125] Se puede usar una composición o formulación en el presente documento para tratar o prevenir una enfermedad neuromuscular que comprende un oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado configurado para hibridar con un ARN que comprende una parte de un transcrito de ARN, en donde el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado comprende al menos 70% de identidad de secuencia con un oligonucleótido de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923-42 115, un vector codificante o comprende dicho oligonucleótido, y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinados casos, la enfermedad neuromuscular es la distrofia muscular facioescapulohumeral. En otros aspectos, puede requerir el uso de un oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado para hibridar con un ARN que comprende una parte de un transcrito de ARN, en donde el oligonucleótido dirigido a DUX4 genomanipulado comprende al menos 70% de identidad de secuencia con un oligonucleótido de una cualquiera de las SEQ ID NO: 41 923-42 115, y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable en la preparación de un medicamento para el tratamiento y prevención de la distrofia muscular facioescapulohumeral.

Cotratamientos

- [126] En algunos aspectos, en el presente documento se describen métodos para administrar un oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal a un sujeto en combinación con un cotratamiento. En algunos aspectos, se pueden administrar simultáneamente uno o más cotratamientos adicionales. En algunos aspectos, se pueden administrar consecutivamente uno o más productos terapéuticos adicionales. En algunos casos, un cotratamiento puede comprender inmunoterapia, terapia hormonal, crioterapia, procedimiento quirúrgico o cualquier combinación de los mismos. Un cotratamiento puede incluir la administración de una composición farmacéutica, tal como una molécula pequeña. Un cotratamiento puede incluir la administración de una composición farmacéutica, tal como uno o más antibióticos. Un cotratamiento puede comprender la administración de un relajante muscular, un antidepresivo, un esteroide, un opioide, un producto terapéutico a base de cannabis,

paracetamol, un antiinflamatorio no esteroideo, un agente neuropático, un cannabis, una progestina, una progesterona, o cualquier combinación de los mismos. Un agente neuropático puede comprender gabapentina. Un antiinflamatorio no esteroideo puede comprender naproxeno, ibuprofeno, un inhibidor de la COX-2 o cualquier combinación de los mismos. Un segundo tratamiento puede comprender la administración de un agente biológico, terapia celular, terapia de medicina regenerativa, un enfoque de ingeniería de tejidos, un trasplante de células madre o cualquier combinación de los mismos. Un cotratamiento puede comprender un procedimiento médico. Un procedimiento médico puede comprender una inyección epidural (tal como una inyección de esteroides), acupuntura, ejercicio, fisioterapia, ultrasonidos, un tratamiento quirúrgico, una manipulación quiropráctica, una manipulación osteopática, una quimionucleolisis o cualquier combinación de los mismos. Un cotratamiento puede comprender el uso de un dispositivo de asistencia respiratoria o un respirador. Un cotratamiento puede comprender la administración de una terapia regenerativa o una inmunoterapia tal como una proteína, una célula madre, una célula de la sangre del cordón umbilical, un tejido del cordón umbilical, un tejido o cualquier combinación de los mismos. Un segundo tratamiento puede comprender un compuesto antiinflamatorio o un compuesto antifibrosis tal como pirfenidona, nintedanib, tocilizumab, micofenolato de mofetilo/ácido micofenólico prednisona, azatioprina o una combinación de los mismos. Un segundo tratamiento puede comprender un medicamento biosimilar.

[127] En algunos aspectos, cuando un cotratamiento es un agente farmacéutico, el agente farmacéutico está incluido en una composición farmacéutica en forma de un fármaco de combinación de dosis fija.

[128] En algunos casos, una pauta posológica de un cotratamiento se puede administrar durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas o aproximadamente 12 semanas. En algunos casos, una pauta posológica se puede administrar durante aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses o aproximadamente 12 meses. En algunos casos, una pauta posológica se puede administrar durante aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años o más de aproximadamente 3 años.

[129] En algunos aspectos, en el presente documento se describen métodos de uso para composiciones de cotratamiento como se describen en el presente documento. En algunos aspectos, una pauta posológica oral diaria puede ser de aproximadamente 0.1 miligramo por kilogramo (mg/kg) a aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal total, de aproximadamente 0.2 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, o de aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg. En algunos aspectos, una pauta posológica parenteral diaria puede comprender de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 000 mg/kg de peso corporal total, de aproximadamente 0.2 mg/kg a aproximadamente 5000 mg/kg, o de aproximadamente 0.5 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg. En algunos aspectos, una pauta posológica tópica diaria puede ser de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 500 mg. En algunos aspectos, una pauta posológica diaria puede ser de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg por día. En algunos aspectos, una cantidad y espaciamiento óptimos de dosis individuales de una composición pueden determinarse por la naturaleza y el grado de una afección que se está tratando, una forma, vía y sitio de administración, y un sujeto particular que se está tratando, y que dichos óptimos pueden determinarse preferiblemente por un método descrito en el presente documento. En algunos aspectos, un número de dosis de composiciones dadas por día durante un número definido de días, lo pueden determinar los expertos en la técnica usando pruebas convencionales de determinación del curso del tratamiento. En algunos aspectos, una pauta posológica la puede determinar el médico responsable y otros factores clínicos. En algunos aspectos, las dosis para cualquier sujeto pueden depender de muchos factores. En algunos aspectos, los factores que afectan a la dosis pueden comprender el tamaño de un sujeto, superficie corporal, edad, un compuesto particular a administrar, sexo, momento y vía de administración, salud general, otros fármacos que se administran simultáneamente o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el progreso se puede vigilar mediante evaluaciones periódicas.

[130] En algunos aspectos, un cotratamiento descrito en el presente documento se puede administrar uno o más días a un sujeto que lo necesite. En algunos aspectos, la administración puede producirse durante aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o aproximadamente 31 días. En algunos aspectos, la administración puede producirse durante aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o aproximadamente 24 meses. En algunos aspectos, la administración puede producirse durante aproximadamente: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,

23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o aproximadamente 50 o más años. En algunos casos, la administración puede producirse de por vida. En algunos aspectos, una composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede administrar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 o más días. En algunos casos, una composición descrita en el presente documento se puede administrar en días consecutivos o días no consecutivos. En algunos casos, una composición descrita en el presente documento se puede administrar a un sujeto más de una vez al día. En algunos casos, una composición descrita en el presente documento se puede administrar a un sujeto: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces al día.

[131] En algunos aspectos, una pauta como una administración habitual de un agente farmacéutico puede estar en un intervalo de 1 µg a 10 mg. En algunos aspectos, una pauta como una administración habitual de una composición farmacéutica puede estar en un intervalo de 10^2 unidades a 10^{10} unidades por día, semana o mes. En algunos aspectos, si una pauta comprende una infusión continua, también puede estar en un intervalo de 1 µg a 10 000 mg de agente farmacéutico. En ciertos casos, el intervalo es de 1 mg por kilogramo de peso corporal a 1000 mg por kilogramo de peso corporal. En algunos aspectos, el progreso se puede vigilar mediante evaluación periódica.

Kits

[132] Un kit puede incluir el oligonucleótido dirigido a DUX4 en un envase, la construcción de ácido nucleico en un envase, el vector en un envase, la composición farmacéutica en un envase. Un kit puede incluir más de un oligonucleótido dirigido a DUX4 en un envase, más de un vector en un envase, más de una construcción de ácido nucleico en un envase o más de una composición farmacéutica en un envase. En algunos casos, un envase puede ser un envase de plástico, vidrio o metal. Un envase puede comprender una jeringa, un vial, una ampolla, una bolsa, un frasco y similares.

[133] Un kit puede incluir una pluralidad de envases, comprendiendo cada envase uno o más oligonucleótidos dirigidos a DUX4, o construcciones de ácido nucleico, o vectores, o composiciones farmacéuticas. Un kit puede incluir un excipiente o un diluyente o un tampón o un medio líquido o de tipo gel para el almacenamiento del oligonucleótido dirigido a DUX4, la construcción de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica. Un kit puede incluir un excipiente o un diluyente o un tampón o un medio líquido o de tipo gel para la administración *in vivo* a un sujeto del oligonucleótido dirigido a DUX4, la construcción de ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica. Puede incluirse un excipiente o

diluyente o tampón o medio líquido o de tipo gel en el envase que contiene el oligonucleótido dirigido a DUX4 (o construcción de ácido nucleico o vector o composición farmacéutica) o contenido en un envase separado. Un kit puede incluir un vehículo de administración, tal como una jeringa o una aguja. Un kit puede incluir uno o más reactivos para un análisis posterior.

- [134] En algunos casos, queda al menos aproximadamente: 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de una cantidad inicial del oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal cuando el oligonucleótido dirigido a DUX4 o su sal puede estar almacenado en un envase cerrado puesto en una habitación durante un periodo de tiempo de al menos aproximadamente: 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses a aproximadamente de aproximadamente 21 a aproximadamente 25 grados Celsius (tal como aproximadamente: 21, 22, 23, 24, 25 grados Celsius) con una humedad atmosférica relativa de aproximadamente 45% a aproximadamente 55% (tal como aproximadamente: 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%). En algunos casos, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 1 año. En algunos casos, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 2 años. En algunos casos, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 6 meses. En algunos casos, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 3 años. En algunos casos, el periodo de tiempo puede ser de aproximadamente 1 mes a aproximadamente 9 meses.

Prueba diagnóstica

- [135] En algunos casos, un método puede comprender además diagnosticar que un sujeto tiene la enfermedad. En algunos casos, un diagnóstico puede comprender emplear una prueba diagnóstica *in vitro*. En algunos casos, el diagnóstico *in vitro* puede ser una prueba diagnóstica complementaria. En otros casos, el diagnóstico puede comprender una prueba diagnóstica *in vivo*.
- [136] Una prueba de diagnóstico puede comprender un procedimiento de imagen, un análisis de hemograma, un análisis de patología tisular, un análisis de biomarcadores, una biopsia, un procedimiento de imagen por resonancia magnética, un reconocimiento médico, un análisis de orina, un procedimiento de ecografía, una prueba genética, una prueba de función hepática, un procedimiento de tomografía por emisión de positrones, una radiografía, serología, un procedimiento de angiografía, un procedimiento de electrocardiografía, una endoscopia, una prueba diagnóstica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una

prueba de Papanicolaou, una prueba de hematocrito, una prueba cutánea de alergia, una prueba de orina, una colonoscopia, un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA), un análisis de microscopía, un examen de médula ósea, una prueba de diagnóstico rápido, una prueba de embarazo, una prueba de función de órganos, una prueba de toxicología, una prueba de enfermedad infecciosa, una prueba de fluidos corporales o cualquier combinación de las mismas.

Sistemas informáticos de control

[137] La presente descripción proporciona sistemas informáticos de control que están programados para implementar métodos de la descripción. La **FIG. 15** muestra un sistema informático 101 que está programado o configurado de otro modo para predecir o confirmar la eficacia de diversas construcciones para el efecto terapéutico, tal como en el tratamiento de la FSHD. El sistema informático 101 puede regular diversos aspectos de la presente descripción, tales como, por ejemplo, modelizar o identificar construcciones para diversas dianas terapéuticas, modelizar la eficacia o estabilidad de construcciones, o cualquier combinación de los mismos. El sistema informático 101 puede ser un dispositivo electrónico de un usuario o un sistema informático que está situado de forma remota con respecto al dispositivo electrónico. El dispositivo electrónico puede ser un dispositivo electrónico móvil.

[138] El sistema informático 101 incluye una unidad central de procesamiento (CPU, también "procesador" y "procesador de ordenador" en el presente documento) 105, que puede ser un procesador de un solo núcleo o de múltiples núcleos, o una pluralidad de procesadores para procesamiento en paralelo. El sistema informático 101 también incluye memoria o ubicación de memoria 110 (p. ej., memoria de acceso aleatorio, memoria de sólo lectura, memoria flash), unidad de almacenamiento electrónico 115 (p. ej., disco duro), interfaz de comunicación 120 (p. ej., adaptador de red) para comunicar con uno o más sistemas diferentes y dispositivos periféricos 125, tales como caché, otra memoria, almacenamiento de datos y/o adaptadores de pantalla electrónica. La memoria 110, unidad de almacenamiento 115, interfaz 120 y los dispositivos periféricos 125 están en comunicación con la CPU 105 a través de un bus de comunicación (líneas continuas), tal como una placa base. La unidad de almacenamiento 115 puede ser una unidad de almacenamiento de datos (o repositorio de datos) para almacenar datos. El sistema informático 101 puede estar acoplado operativamente a una red informática ("red") 130 con la ayuda de la interfaz de comunicación 120. La red 130 puede ser Internet, un internet y/o extranet, o una intranet y/o

extranet que está en comunicación con Internet. La red 130 en algunos casos es una red de telecomunicaciones y/o datos. La red 130 puede incluir uno o más servidores informáticos, que pueden permitir la informática distribuida, tal como la informática en la nube. La red 130, en algunos casos con la ayuda del sistema informático 101, puede implementar una red entre pares, que puede permitir que los dispositivos acoplados al sistema informático 101 se comporten como un cliente o un servidor.

- [139]** La CPU 105 puede ejecutar una secuencia de instrucciones legible por máquina, que pueden estar incorporadas en un programa o software. Las instrucciones pueden estar almacenadas en un sitio de memoria, tal como la memoria 110. Las instrucciones pueden dirigirse a la CPU 105, que posteriormente puede programar o configurar de otro modo la CPU 105 para implementar métodos de la presente descripción. Ejemplos de operaciones realizadas por la CPU 105 pueden incluir buscar, decodificar, ejecutar y reescribir.
- [140]** La CPU 105 puede ser parte de un circuito, tal como un circuito integrado. Pueden estar incluidos uno o más de otros componentes del sistema 101 en el circuito. En algunos casos, el circuito es un circuito integrado para aplicaciones específicas (ASIC).
- [141]** La unidad de almacenamiento 115 puede almacenar archivos, tales como controladores, bibliotecas y programas guardados. La unidad de almacenamiento 115 puede almacenar datos de usuario, p. ej., preferencias de usuario y programas de usuario. El sistema informático 101 en algunos casos puede incluir una o más unidades de almacenamiento de datos adicionales que son externas al sistema informático 101, tales como las situadas en un servidor remoto que está en comunicación con el sistema informático 101 a través de una intranet o Internet.
- [142]** El sistema informático 101 puede comunicarse con uno o más sistemas informáticos remotos a través de la red 130. Por ejemplo, el sistema informático 101 puede comunicarse con un sistema informático remoto de un usuario. Ejemplos de sistemas informáticos remotos incluyen ordenadores personales (p. ej., PC portátiles), pizarras o tabletas (p. ej., iPad de Apple®, Samsung® Galaxy Tab), teléfonos, teléfonos inteligentes (p. ej., iPhone de Apple®, dispositivos habilitados para Android, Blackberry®), o asistentes digitales personales. El usuario puede acceder al sistema informático 101 a través de la red 130.
- [143]** Los métodos como se describen en el presente documento pueden implementarse mediante un código ejecutable por máquina (p. ej., procesador de ordenador) almacenado en un sitio de almacenamiento electrónico del sistema informático 101, tal como, por ejemplo, en la memoria 110 o la unidad de almacenamiento electrónico 115. El código ejecutable por máquina o legible por máquina se puede proporcionar en forma de software.

Durante el uso, el código puede ser ejecutado por el procesador 105. En algunos casos, el código puede recuperarse de la unidad de almacenamiento 115 y almacenarse en la memoria 110 para que el procesador 105 pueda acceder fácilmente. En algunas situaciones, la unidad de almacenamiento electrónico 115 puede estar excluida y las instrucciones ejecutables automáticas se almacenan en la memoria 110.

[144] El código puede precompilarse y configurarse para usar con una máquina que tenga un procesador adaptado para ejecutar el código o puede compilarse durante el tiempo de ejecución. El código puede suministrarse en un lenguaje de programación que se puede seleccionar para permitir que el código se ejecute de forma precompilada o tal como está compilado.

[145] Aspectos de los sistemas y métodos proporcionados en el presente documento, tales como el sistema informático 101, pueden incorporarse en programación. Varios aspectos de la tecnología pueden considerarse "productos" o "artículos de fabricación", normalmente en forma de código ejecutable por máquina (o procesador) y/o datos asociados que se llevan o incorporan en un tipo de medio legible por máquina. El código ejecutable por máquina puede almacenarse en una unidad de almacenamiento electrónico, tal como una memoria (p. ej., memoria de sólo lectura, memoria de acceso aleatorio, memoria flash) o un disco duro. Los medios de tipo "almacenamiento" pueden incluir cualquiera o toda la memoria tangible de los ordenadores, procesadores o similares, o módulos asociados a los mismos, tales como diversas memorias de semiconductores, unidades de cinta, unidades de disco y similares, que pueden proporcionar almacenamiento no transitorio en cualquier momento para la programación del software. En ocasiones, todo o parte del software puede comunicarse a través de Internet o de otras redes de telecomunicaciones diversas. Dichas comunicaciones, por ejemplo, pueden permitir la carga del software desde un ordenador o procesador a otro, por ejemplo, desde un servidor de administración u ordenador base a la plataforma informática de un servidor de aplicaciones. Por lo tanto, otro tipo de medio que puede llevar los elementos de software incluye ondas ópticas, eléctricas y electromagnéticas, tales como las usadas a través de interfaces físicas entre dispositivos locales, a través de redes terrestres cableadas y ópticas y a través de diversas conexiones aéreas. Los elementos físicos que transportan dichas ondas, como enlaces cableados o inalámbricos, enlaces ópticos o similares, también pueden considerarse medios que llevan el software. Como se usa en el presente documento, a menos que se restrinja a medios de "almacenamiento" tangibles, no transitorios, expresiones tales como "medio legible" por

ordenador o máquina se refieren a cualquier medio que participe proporcionando instrucciones a un procesador para su ejecución.

[146] Por lo tanto, un medio legible por máquina, tal como un código ejecutable por ordenador, puede adoptar muchas formas, incluyendo, pero no limitadas a, un medio de almacenamiento tangible, un medio de onda portadora o medio de transmisión física. Los medios de almacenamiento no volátiles incluyen, por ejemplo, discos ópticos o magnéticos, tales como cualquiera de los dispositivos de almacenamiento en cualquier ordenador o similares, tales como los que pueden usarse para implementar las bases de datos, etc., que se muestran en los dibujos. Los medios de almacenamiento volátiles incluyen la memoria dinámica, tal como la memoria principal de dicha plataforma informática. Los medios de transmisión tangibles incluyen cables coaxiales; hilo de cobre y fibra óptica, incluyendo los hilos que componen un bus dentro de un sistema informático. Los medios de transmisión de ondas portadoras pueden tener la forma de señales eléctricas o electromagnéticas, u ondas acústicas o luminosas tales como las generadas durante las comunicaciones de datos por radiofrecuencia (RF) e infrarrojos (IR). Por lo tanto, las formas comunes de medios legibles por ordenador incluyen, por ejemplo: un disquete, un disco flexible, disco duro, cinta magnética, cualquier otro medio magnético, un CD-ROM, DVD o DVD-ROM, cualquier otro medio óptico, tarjetas y cinta de papel perforadas, cualquier otro medio de almacenamiento físico con patrones de agujeros, una RAM, una ROM, una PROM y EPROM, una FLASH-EPROM, cualquier otro chip o cartucho de memoria, una onda portadora que transporte datos o instrucciones, cables o enlaces que transporten dicha onda portadora, o cualquier otro medio desde el que un ordenador pueda leer códigos de programación y/o datos. Muchas de estas formas de medios legibles por ordenador pueden estar implicadas en llevar una o más secuencias de una o más instrucciones a un procesador para la ejecución.

[147] El sistema informático 101 puede incluir o estar en comunicación con una pantalla electrónica 135 que comprende una interfaz de usuario (UI) 140 para proporcionar, por ejemplo, uno o más resultados (resultados inmediatos o resultados archivados de un método anterior), una o más entradas de usuario, un valor de referencia o derivado del mismo de una biblioteca o base de datos, o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de UI incluyen, pero no se limitan a, una interfaz gráfica de usuario (GUI) y una interfaz de usuario basada en la red.

[148] En algunos casos, como se muestra en la **FIG. 15**, se puede obtener una muestra 202 que contiene un material genético de un sujeto 201, tal como un sujeto humano. Una muestra

202 se puede someter a uno o más métodos como se describe en el presente documento, tales como llevar a cabo un ensayo. En algunos casos, un ensayo puede comprender secuenciación (tal como secuenciación por nanoporos), genotipado, hibridación, amplificación, marcado o cualquier combinación de los mismos. Se pueden introducir uno o más resultados de un método en un procesador 204. Se pueden introducir uno o más parámetros de entrada tales como una identificación de muestra, identificación de sujeto, tipo de muestra, una referencia u otra información en un procesador 204. Se pueden introducir una o más medidas de un ensayo en un procesador 204 de modo que el procesador puede producir un resultado, tal como un diagnóstico de enfermedad neuromuscular o una recomendación para un tratamiento. Un procesador puede enviar un resultado, un parámetro de entrada, una medida, una referencia o cualquier combinación de los mismos a una pantalla 205, tal como una pantalla de visualización o una interfaz gráfica de usuario. Un procesador 204 puede (i) enviar un resultado, un parámetro de entrada, una medida o cualquier combinación de los mismos a un servidor 207, (ii) recibir un resultado, un parámetro de entrada, una medida o cualquier combinación de los mismos desde un servidor 207, (iii) o una combinación de los mismos.

[149] Los métodos y sistemas de la presente descripción pueden implementarse mediante uno o más algoritmos. Un algoritmo se puede implementar mediante software tras su ejecución por la unidad central de procesamiento 105. El algoritmo puede, por ejemplo, determinar construcciones optimizadas por medio de aprendizaje supervisado para optimizar la eficacia terapéutica, estabilidad u otro atributo de una o más construcciones.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Secuencia de DUX4 de muestras de músculo esquelético

[150] Se realizó un análisis a partir de datos de RNA-seq de un total de 95 muestras de músculo esquelético, de las cuales 70 procedían de pacientes con FSHD y 25 de individuos sanos. Las muestras usadas eran de los siguientes tres conjuntos de datos disponibles públicamente: Yao et al. 2014 (28) Wong et al. 2020 (17) y Wang et al. 2019 (29). Los resultados de este análisis se muestran en la FIG. 3. Sin embargo, este enfoque no consiguió generar suficientes datos para predecir en la mayoría de pacientes la variación de secuencia de ARN de la secuencia que codifica DUX4 debido al hecho de que DUX4 se expresa en un nivel tan bajo que solo se identificaron 1 o 2 lecturas por muestra de secuencia. Para predecir con confianza la variación de secuencia entre individuos, normalmente se requieren

de 50 a 100x recuentos de lectura por muestra. Sólo una pequeña región de DUX4 situada en el exón 1 cumplía este criterio.

EJEMPLO 2: Secuencia de DUX4 de muestras de testículos

[151] Los autores de la invención decidieron ensayar esta hipótesis negativa y analizar datos de RNA-seq de muestras de testículos de 206 individuos (30). Inesperadamente, este conjunto de datos fue suficiente para predecir la variación entre los exones 1,2,3 de los transcritos específicos del músculo con una cobertura media de 117X a lo largo de esta secuencia (FIG. 4). A partir de este conjunto de datos se pudieron determinar varias regiones de la secuencia que codifica DUX4 que están conservadas en >85% que eran prometedoras en el enfoque. Sin embargo, varias regiones de DUX4 todavía no tenían suficiente cobertura para predecir con precisión la conservación, probablemente debido a la diferencia en las isoformas de corte y empalme.

Ejemplo 3: Secuencia de DUX4 de base de datos de muestras de músculo y testículo combinadas.

[152] Para resolver este problema, se consideró un enfoque único y sin precedentes y se combinaron RNA-seq de músculo y RNA-seq de testículo en un conjunto de datos combinado y se llevó a cabo el análisis. Para este análisis final se pudieron obtener 486 muestras de testículos de GTEx y se usaron las 95 muestras de músculo esquelético del Ejemplo 1. Este análisis final generó los mejores datos dando una cobertura de lecturas de >50x para más de 97% del gen DUX4, permitiendo la predicción precisa del sitio diana de DUX4 y los pares de OTN que están conservados en más de 85% entre pacientes (Tabla 4). Como se describió anteriormente, todas las secuencias de OTN resultantes y las secuencias del sitio diana de DUX4 emparejadas, todas representadas en forma de ADN, se envían como un archivo xml que abarca las SEQ ID NO 1-41 922. Estos datos serán útiles para identificar tramos adecuados de 15-25 bases en la secuencia de DUX4 que están conservados entre la mayoría de pacientes con FSHD y la selección para el desarrollo de fármacos de OTN.

Tabla 4: Regiones de DUX4 conservadas

190173724-190173916, 190173917-190173950, 190173951-190174011, 190174012-190174073, 190174074-190174231, 190174232-190174291, 190174292-190174343, 190174344-190174517, 190174518-190174941, 190174942-190175068, 190175069-190175149, 190175150-190175197, 190175198-190175218, 190175219-190175285, 190175286-190175414, 190175415-190175588, 190175589-190175654, 190175655-190175713, 190175714-190175816, 190175817-190175918, 190175919-190176359, 190176360-190176589, 190176590-190178325, 190178326-190178341, 190178342-190178384, 190178385-190178402, 190178403-190178458, 190178459-190178528,

190178529-190178585, 190178586-190178886, 190178887-190179164, 190179165-190179573, 190179574-190179602, 190179603-190179746, 190179747-190179926, 190179927-190180010, 190180011-190180125, 190180126-190180225, 190180226-190181024, 190181025-190181092, 190181093-190181112, 190181113-190181219, 190181220-190181254, 190181255-190181291, 190181292-190181441, 190181442-190181625, 190181626-190181656, 190181657-190181909, 190181910-190181954, 190181955-190182178, 190182179-190182208, 190182209-190182254, 190182255-190182357, 190182358-190182437, 190182438-190183539, 190183540-190183738, 190183739-190183811, 190183812-190183834, 190183835-190184392, 190184393-190184588, 190184589-190184611, 190184612-190184807, 190184808-190184858, 190184859-190185155, 190185156-190185731, 190185732-190185762, 190185763-190185826, 190185827-190185947.

- [153] En relación con la **Tabla 4**, las secuencias contiguas que codifican DUX4 en el cromosoma 4q35 están conservadas en >85% entre los individuos y podrían servir como sitios diana para los ONT dirigidos a DUX4 para el tratamiento de la FSHD. La secuencia de ADN de DUX4 y las coordenadas indicadas se alinean con la versión 101 de Ensemble (GRCh38.p13).
- [154] Haciendo referencia a la **FIG. 1**, esta figura representa modificaciones genéticas que conducen a la FSHD. La FSHD tipo 1 es el resultado de una delección de las repeticiones D4Z4 en el cromosoma 4q35 de aproximadamente 100 a menos de 11 repeticiones, que conduce a la apertura de la cromatina y la expresión de DUX4. La FSHD tipo 2 es el resultado de una mutación de pérdida de función en el factor epigenético SMCHD1 que conduce a la desmetilación de las repeticiones D4Z4 en 4q35, la apertura de la cromatina y la expresión de DUX4.
- [155] Haciendo referencia a la **FIG. 2**, esta figura muestra transcritos de DUX4 cortados y empalmados alternativamente procedentes de regiones D4Z4. ENST00000616166.1, ENST00000569241.5 y ENST00000570263.5 están asociados con la FSHD cuando se expresan en un tejido muscular. Los transcritos ENST00000565211.1, ENST00000563716.5 y ENST00000564366.1 se expresan normalmente en otros tejidos y no están asociados con el trastorno. Por ejemplo, ENST00000563716.5 se expresa en los testículos.
- [156] Haciendo referencia a la **FIG. 3**, esta figura muestra la cobertura de lecturas de los datos de RNA-Seq de transcritos de DUX4 cortados y empalmados alternativamente de tejido de biopsia de FSHD y de músculo sano.
- [157] Haciendo referencia a la **FIG. 4**, esta figura muestra la cobertura de lecturas de datos de RNA-Seq de transcritos de DUX4 cortados y empalmados alternativamente del testículo.

Los transcritos de DUX4 cortados y empalmados alternativamente ENST00000616166.1, ENST00000569241.5 y ENST00000570263.5 están asociados con la FSHD cuando se expresan en el tejido muscular.

[158] Haciendo referencia a la **FIG. 5**, esta figura muestra que las modificaciones químicas de los ASO dirigidos a DUX4 pueden mejorar la estabilidad del ASO frente a las nucleasas biológicas. Los ASO dirigidos a DUX4 se incubaron en suero humano al 10% a 37°C durante los periodos de tiempo indicados. La estabilidad de ASO en cada punto temporal se visualizó por desnaturalización por Urea-PAGE. El Oligo no modificado, muestra un ejemplo de un ácido nucleico de ADN no modificado que tiene semivida muy baja, el Oligo Con. Neg. muestra un ASO que no se dirige a DUX4 pero tiene modificaciones químicas similares mientras que los otros paneles muestran ASO transformados químicamente que se dirigen a DUX4. Un ejemplo excepcional presenta la estabilidad frente a nucleasas biológicas durante 7 días (168 horas).

[159] Haciendo referencia a la **Tabla 5**, esta tabla muestra la semivida calculada de los ASO modificados químicamente que se dirigen a DUX4 para nucleasas biológicas. Los ASO de DUX4 se incubaron en suero humano al 10% a 37°C en diferentes puntos temporales y se visualizaron por Urea-PAGE. Se realizó densitometría en cada punto temporal y se calculó y promedió la estabilidad de ASO en cada punto temporal basándose en la fórmula $N(t) = N_0(1/2)^{t/(1/2)}$ donde $N(t)$ es la señal en el punto temporal t , N_0 es la señal al inicio antes de la incubación con nucleasas y $t(1/2)$ es la semivida. No modificado se refiere a ARN no modificado químicamente, mientras que Oligo Con. Neg. se refiere a un ASO que está modificado químicamente pero no se dirige a DUX4.

Tabla 5: Semivida en suero humano			
ID ASO	Semivida (Horas)	ID ASO	Semivida (Horas)
No modificado	0.05	AS-DX-059-1	>720
Oligo Con. Neg.	>720	AS-DX-098-1	427
AS-DX-001	119	AS-DX-099-1	>720
AS-DX-002-1	15	AS-DX-027-2	>720
AS-DX-002-2	291	AS-DX-027-3	>720
AS-DX-005-1	63	AS-DX-027-4	>720
AS-DX-008-1	124	AS-DX-100-01	>720
AS-DX-010-1	150	AS-DX-101-01	>720
AS-DX-010-2	505	AS-DX-102-01	>720
AS-DX-011-1	282	AS-DX-103-01	>720
AS-DX-012-1	700	AS-DX-105-01	353
AS-DX-015-1	336	AS-DX-033-2	601
AS-DX-101-1	139	AS-DX-033-3	>720
AS-DX-102-1	238	AS-DX-107-1	433

AS-DX-103-1	77	AS-DX-108-1	334
AS-DX-104-1	108	AS-DX-50-3	>720
AS-DX-105-1	45	AS-DX-50-4	>720
AS-DX-106-1	256	AS-DX-110-1	668
AS-DX-107-1	128	AS-DX-111-1	540
AS-DX-108-1	118	AS-DX-59-2	611
AS-DX-120-1	111	AS-DX-112-1	>720
AS-DX-007-1	>720	AS-DX-59-3	>720
AS-DX-016-1	>720		
AS-DX-018-1	387		
AS-DX-023-1	339		
AS-DX-025-1	857		
AS-DX-027-1	487		
AS-DX-028-1	221		
AS-DX-029-1	377		
AS-DX-030-1	538		
AS-DX-033-1	198		
AS-DX-038-1	174		
AS-DX-040-1	322		
AS-DX-041-1	>720		
AS-DX-050-1	350		
AS-DX-052-1	91		
AS-DX-057-1	401		

[160] Haciendo referencia a la **FIG. 6A**, esta figura muestra reducciones en la inmunoestimulación innata para ASO de DUX4 genomanipulados. Se sembraron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) ($\sim 2-6 \times 10^5$ células) en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se transfectaron los ASO indicados en concentraciones de 133 nM durante 48 horas con reactivo RNAiMAX. Los niveles de IFN- α (eje izquierdo) y TNF- α (eje derecho) en los medios sobrenadantes se cuantificaron por ELISA para 6 pacientes. Poli (dA:dT) (Con. Pos. n.º 1) y un oligonucleótido inmunoestimulador (Con. Pos. n.º 2) sirvieron como controles positivos para la inmunoestimulación. RNAiMAX sin oligonucleótido sirvió como control negativo inicial (valor inicial), mientras que la transfección con un ARN no inmunoestimulador que no se dirige a DUX4 (Con. Neg.) demostró una inmunoestimulación baja.

[161] Haciendo referencia a la **FIG. 6B**, esta figura muestra además reducciones en la inmunoestimulación innata para ASO de DUX4 genomanipulados por medio del ensayo de células Raw-Blue (Invivogen, raw-sp). En resumen, las células se sembraron en placas a 100 000 células/pocillo en 150 μ l en una placa de 96 pocillos con fondo en U (Thermo, 163320) en DMEM (Thermo, 11965092) con FBS al 10% (Thermo, 10082147). Después de 24 horas, se mezclan 22.34 μ l de OptiMEM (Thermo, 31985088) con 2.66 μ l de ASO 10

μM (por pocillo) y 1 μl de Lipofectamine (por pocillo). Luego se añaden mezclas de Lipofectamine/ASO a cada pocillo de células Raw para llegar a una concentración final de ASO de 133 nM. Como controles positivos se usan poli(dA:dT) (Invivogen, tlr1-patn) a 1-10 ng/ml, CpG (invivogen, tlr1-1585) a 133 nM. Las células se incuban durante 1 día a 37 grados/5% de CO₂ con la mezcla de transfección/ASO. Después de la incubación, se centrifuga suavemente la placa a 300 xg durante 5 min, luego se recogen 20 μl de cada pocillo y se añaden a una nueva placa de 96 pocillos, de fondo plano (VWR, 29442-056). Se añaden 180 ul de QUANTI-Blue (Invivogen, rep-qbs) a cada pocillo de líquido sobrenadante y se incuba durante 30 min-6 horas a 37 grados/5% de CO₂. Se lee la absorbancia a 620-655 nm usando Cytation 5 (Biotek). Los datos representan la media de seis pocillos repetidos y las barras de error representan la desviación estándar.

[162] Haciendo referencia a la **FIG. 7**, Diseño del ensayo HTS de ASO de DUX4. Mioblastos estables humanos o de ratón que expresan eGFP con la secuencia codificante de DUX4 en la 3' UTR. La expresión constitutiva de esta construcción es estimulada por CMV para una expresión fuerte y ubicua. Se transcribe el ARNm no modificado que codifica el transcrito de eGFP-UTR-DUX4 y se traduce la secuencia de eGFP. La traducción de la proteína tóxica DUX4 se previene mediante un codón de parada al final de la secuencia de eGFP y la mutación del codón de inicio de DUX4. Los ASO que se dirigen eficazmente a DUX4 pueden unirse al transcrito de fusión e inducir la degradación a través de la ARNasa H o RISC, previniendo la expresión de la proteína GFP. Después del tratamiento, se puede observar una reducción de la fluorescencia en las células no tratadas y en la transfección del control negativo en comparación con los ASO experimentales ensayado mediante lector de placas o análisis de imágenes para generar de manera eficiente resultados reproducibles que comparan la eficacia de los ASO dirigidos a DUX4. Se desarrollaron dos ensayos indicadores, uno en la línea de mioblastos de ratón inmortalizados C2C12 y otro en la línea de mioblastos de FSHD humana inmortalizada 15 Abic.

[163] Con referencia a la Tabla 6, esta tabla presenta la reducción de expresión de un ensayo de cribado de indicadores GFP DUX4 estables. En placas de 96 pocillos con fondo transparente, paredes negras, se siembran 10 000 células estables 15Abic o 1500 células estables C2C12 en sus respectivos medios. Al día siguiente después de la unión, las células se transfectan usando el reactivo de transfección Lipofectamine™ (13778075, Thermo Fisher Scientific). Por cada pocillo se mezclaron 0.20 μl/pocillo de Lipofectamine® RNAiMAX con 5 μl de Opti-MEM y se incubó durante 5 minutos. Después se añade un volumen igual de 20x ASO en Opti-MEM de manera que el volumen total de las dos mezclas

de transfección era 10 µl/pocillo y de manera que la concentración final de ASO en un volumen total de pocillo de 200 µl es 12.5 nM para células c2cl2 o 25 nM para células 15Abic. La mezcla ASO-Opti-MEM se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Luego se añadieron 10 µl de la mezcla de reactivos de transfección resultante a cada pocillo experimental. Después de 6 h, se añade medio de cultivo celular normal a cada pocillo y luego las placas se incubaron durante 72 - 96 h a 37°C. Luego, el medio se sustituyó por 50 µl de medio FluoroBrite DMEM (A1896701, Thermo Fisher Scientific) suplementado con L-glutamina y piruvato sódico 4 mM y 1 mM respectivamente para la lectura. La intensidad de fluorescencia para cada pocillo se midió a 390+10 nm de excitación y 510+10 nm de emisión en un lector multimodo de imágenes de células Cytation 5 (Biotek Instruments). Después de la medición de la fluorescencia, se separó el FluoroBrite DMEM exento de suero y se añadieron 100 µl de medio normal a cada pocillo y se usó WST-8 para medir la viabilidad celular/recuento de células. Las mediciones de viabilidad celular siguieron el protocolo del fabricante. Brevemente, posteriormente se añadieron 10 µl de WST-8 (ab228554, Abcam) a cada pocillo y la placa se osciló para distribuir el reactivo de manera uniforme. Luego las placas se devolvieron a la incubadora durante 30 min a 3 horas dependiendo de la densidad celular y el tipo de célula. Para medir la viabilidad celular, se midió la absorbancia a 460 nm en un Cytation 5. Las mediciones de GFP para cada pocillo se normalizan respecto al recuento de células con WST-8. Los valores de la tabla representan la expresión media de GFP de seis pocillos repetidos y se muestran como una fracción del tratamiento con un ASO de control negativo.

Tabla 6 – Reducción de la expresión del indicador GFP-DUX4 con terapias de oligonucleótidos.

Ensayo de indicador GFP en C2C12			Ensayo de indicador GFP en 15Abic	
Nombre de ASO	FC media		Nombre de ASO	FC media
Con. Neg.	0.99		Con. Neg.	1.00
AS-DX-001-1	0.86		AS-DX-015-1	0.81
AS-DX-002-1	0.78		AS-DX-015-3	0.62
AS-DX-003-1	0.93		AS-DX-018-1	0.65

AS-DX-004-1	0.86		AS-DX-028-1	0.77
AS-DX-005-1	0.88		AS-DX-029-1	0.65
AS-DX-006-1	0.96		AS-DX-030-1	0.63
AS-DX-008-1	0.84		AS-DX-033-1	0.54
AS-DX-009-1	0.70		AS-DX-050-1	0.81
AS-DX-010-1	0.59		AS-DX-052-1	0.71
AS-DX-011-1	0.54		AS-DX-059-1	0.39
AS-DX-012-1	0.67		AS-DX-102-1	0.80
AS-DX-015-1	0.66		AS-DX-094-1	0.60
AS-DX-015-3	0.41		AS-DX-104-1	0.37
AS-DX-018-1	0.54		AS-DX-033-2	0.82
AS-DX-019-1	0.84		AS-DX-033-3	0.70
AS-DX-021-1	0.99		AS-DX-105-1	0.83
AS-DX-022-1	0.85		AS-DX-106-1	0.84
AS-DX-023-1	0.53		AS-DX-059-2	0.39
AS-DX-025-1	0.57		AS-DX-112-1	0.47
AS-DX-026-1	0.55		AS-DX-114-1	0.77
AS-DX-027-1	0.33		AS-DX-116-1	0.69
AS-DX-028-1	0.55		AS-DX-117-1	0.70
AS-DX-029-1	0.53		AS-DX-118-1	0.79
AS-DX-030-1	0.56		AS-DX-119-1	0.64
AS-DX-032-1	0.80		AS-DX-120-1	0.78
AS-DX-033-1	0.53		AS-DX-122-1	0.53
AS-DX-034-1	0.89		AS-DX-123-1	0.40
AS-DX-035-1	0.87		AS-DX-124-1	0.44
AS-DX-036-1	1.03		AS-DX-125-1	0.41
AS-DX-037-1	0.87		AS-DX-126-1	0.62
AS-DX-038-1	0.53		AS-DX-031-1	0.37
AS-DX-040-1	0.48		AS-DX-128-1	0.42

AS-DX-041-1	0.43		AS-DX-129-1	0.60
AS-DX-043-1	0.83		AS-DX-130-1	0.51
AS-DX-044-1	0.75		AS-DX-131-1	0.96
AS-DX-045-1	0.59		AS-DX-132-1	0.86
AS-DX-046-1	0.97		AS-DX-133-1	0.45
AS-DX-018-2	0.82		AS-DX-133-2	0.40
AS-DX-048-1	0.84		AS-DX-134-2	0.88
AS-DX-049-1	0.89		AS-DX-135-1	0.80
AS-DX-050-1	0.98		AS-DX-136-1	0.61
AS-DX-051-1	0.66		AS-DX-137-1	0.69
AS-DX-052-1	0.59		AS-DX-045-2	0.63
AS-DX-054-1	0.86		AS-DX-138-1	0.67
AS-DX-055-1	0.87		AS-DX-139-1	0.66
AS-DX-057-1	0.67		AS-DX-106-2	0.71
AS-DX-058-1	0.72		AS-DX-140-1	0.79
AS-DX-059-1	0.27		MRC-2107	0.64
AS-DX-023-2	0.60			
AS-DX-023-3	0.39			
AS-DX-098-1	0.62			
AS-DX-099-1	0.55			
AS-DX-027-2	0.55			
AS-DX-027-3	0.68			
AS-DX-027-4	0.56			
AS-DX-100-1	0.50			
AS-DX-094-1	0.44			
AS-DX-104-1	0.34			
AS-DX-033-2	0.42			
AS-DX-033-3	0.18			
AS-DX-105-1	0.29			

AS-DX-106-1	0.50			
AS-DX-107-1	0.30			
AS-DX-108-1	0.23			
AS-DX-059-2	0.50			
AS-DX-112-1	0.50			
AS-DX-113-1	0.58			
AS-DX-059-3	0.20			
AS-DX-116-1	0.90			
AS-DX-117-1	0.89			
AS-DX-118-1	0.94			
AS-DX-119-1	0.63			
AS-DX-120-1	0.78			
AS-DX-128-1	0.62			
AS-DX-129-1	0.70			
AS-DX-130-1	0.94			
AS-DX-131-1	0.84			
AS-DX-132-1	0.63			
AS-DX-133-1	0.56			
AS-DX-133-2	0.75			
AS-DX-134-1	0.74			
AS-DX-134-2	0.77			
AS-DX-135-1	0.88			
AS-DX-137-1	0.52			
AS-DX-045-2	0.91			
AS-DX-139-1	0.76			
AS-DX-106-2	0.82			
AS-DX-140-1	0.53			
AS-DX-033-4	0.69			
AS-DX-141-1	0.59			

AS-DX-112-2	0.54			
AS-DX-142-1	0.72			
MRC-2107	0.71			

[164] Haciendo referencia a la **FIG. 8A**, esta figura muestra que los ASO terapéuticos tienen una fuerte reducción de la expresión de DUX4 en los miotubos de FSHD. Los mioblastos de FSHD inmortalizados se sembraron al 80% de confluencia y 24 horas después se transfectaron con ASO de control o anti-DUX4 50 nM o 25 nM con Lipofectamine RNAimax (Thermo) seguido de una incubación de 24 horas. Luego, las células se diferenciaron durante 96 horas en miotubos de FSHD positivos para DUX4 antes de recoger el ARN total y realizar la qRT-PCR. Se utilizó GAPDH como control interno. Los valores representan la media de dos experimentos con tres repeticiones técnicas cada uno, y las barras de error representan SEM *p<0.05 según la prueba t de Student para ambas dosis.

[165] Haciendo referencia a la **FIG. 8B** y **Tabla 7** que presentan la reducción de expresión de DUX4 y los genes ZSCAN4 y SLC34A2 inducidos por DUX4 en mioblastos de FSHD. Se sembraron células 15Abic o C6 en medio de células precursoras miogénicas humanas (hMPC) a una densidad de 150 000 células por pocillo en doce placas de cultivo celular de 24 pocillos. El medio hMPC está compuesto por 500 ml de RoosterBasal™-MSC, 10 ml de RoosterBooster™-MSC (KT-001, RoosterBio), 91 ml de suero bovino fetal (10082147, Thermo Fisher) y 50 ml de piruvato sódico 100 mM (11360070, Termo Fisher). Tres días después de sembrar células en medio hMPC, el medio se reemplazó por medio de diferenciación de hMPC que está compuesto por 500 ml de RoosterBasal™-MSC, 10 ml de RoosterBooster™-MSC, 11.4 ml de suero de caballo (16050130, Thermo Fisher) y 50 ml de piruvato sódico 100 mM. Diez días después de sembrar células en medio hMPC (siete días después de sembrar células en medio de diferenciación hMPC), las células se transfectaron directamente usando 0.875 µl de reactivo de transfección Lipofectamine™ RNAiMAX (13778075, Thermo Fisher) y ASO 3.125 nM o 6.5 nM en un volumen de pocillo de 1 ml según las indicaciones del fabricante. Cinco días después de la transfección, las células se lisaron en 350 µl de tampón RLT (79216, Qiagen). El ARN se extrajo usando el kit de ARN Direct-zol-96 (R2056, Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de ARN purificado se determinó usando un NanoDrop 1000 (Thermo Fisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se generó siguiendo las instrucciones del fabricante para el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript™

IV con el kit de enzimas ezDNase™ (18091150, Thermo Fisher) con las siguientes modificaciones. Se añadió 1 µl de ditiotritol 110 µM después de la digestión del ADN genómico. Se usó 1 µl de Oligo d(T)20 anclado 50 µM como cebador durante la transcripción inversa. Después de la generación de ADNc, se realizó la qPCR para cuantificar tres genes diana: DUX4-fl (DUX4 de longitud completa), SLC34A2 y ZSCAN4, así como un gen de control: RPL13A. Se realizó una reacción de qPCR multiplexada basada en sondas usando cebadores y sondas de PrimeTime qPCR de inactivación doble (un cebador directo, un cebador inverso y una sonda constituyen un ensayo). Brevemente, en cada pocillo de una placa de 96 pocillos se mezclaron 10 µl de mezcla maestra de expresión génica PrimeTime® (1055772, Integrated DNA Technologies) con 100 ng de ADNc y 0.25 µl de cada ensayo 20X (DUX4-fl, SLC34A2, ZSCAN4, RPL13A) junto con un volumen de agua tal que el volumen total de cada uno era 20 µl. El ciclo térmico y la lectura de placas se hicieron usando un LightCycler 96 (Roche Diagnostics). Las condiciones de los ciclos eran las siguientes: activación de la polimerasa a 95°C durante 180 segundos, desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y reasociación/extensión a 60°C durante 60 segundos con las etapas de desnaturalización y reasociación/extensión repetidos durante 40 ciclos. La fluorescencia se leyó al final de la etapa de reasociación/extensión después de cada ciclo. El umbral del ciclo se determinó automáticamente usando el software LightCycler 96. La expresión relativa normalizada de los genes diana se calculó siguiendo el método descrito por Taylor et al., 2019 (“The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time”). La expresión de los tres genes diana después se sumó y se produjo un gráfico de barras que describe la reducción de expresión compuesta, relativa y normalizada de los genes diana en relación con un ASO de control negativo.

Tabla 7. qRT-PCR para la reducción de expresión de DUX4 y los genes regulados por DUX4 ZSCAN4 y SLC34A2 después de tratamiento con 3.125 nM con ODN dirigidos a DUX4.

Nombre de ASO	Expresión de DUX4fl	Error DUX4 fl	Nombre de ASO	Expresión de ZSCAN 4	Error ZSCAN 4	Expresión de SLC34A 2	Error SLC34A2
ASO Con. Neg.	1.00	0.66	ASO Con. Neg	1.00	0.41	1.00	0.75
AS-DX-001-1	0.03	0.01	AS-DX-002-1	0.83	0.09	0.51	0.14
AS-DX-002-1	0.24	0.19	AS-DX-008-1	1.11	0.24	0.65	0.29
AS-DX-003-1	0.05	0.01	AS-DX-015-1	0.93	0.09	0.07	0.12

AS-DX-004-1	0.32	0.25
AS-DX-005-1	0.06	0.00
AS-DX-006-1	0.15	0.09
AS-DX-007-1	0.14	0.09
AS-DX-008-1	0.10	0.05
AS-DX-010-1	0.19	0.16
AS-DX-011-1	0.22	0.17
AS-DX-012-1	0.18	0.12
AS-DX-015-1	0.28	0.17
AS-DX-015-3	0.04	0.00
AS-DX-018-1	0.05	0.00
AS-DX-019-1	0.03	0.00
AS-DX-021-1	0.87	0.87
AS-DX-022-1	0.18	0.14
AS-DX-023-1	0.21	0.17
AS-DX-025-1	0.07	0.01
AS-DX-026-1	0.07	0.01
AS-DX-027-1	0.05	0.00
AS-DX-028-1	0.22	0.18
AS-DX-029-1	0.06	0.00
AS-DX-030-1	0.04	0.00
AS-DX-032-1	0.13	0.01
AS-DX-033-1	0.11	0.03
AS-DX-034-1	0.09	0.03
AS-DX-035-1	0.12	0.03
AS-DX-036-1	0.04	0.01
AS-DX-037-1	0.06	0.00

AS-DX-015-3	0.77	0.13	0.72	0.41
AS-DX-018-1	1.11	0.04	0.86	0.44
AS-DX-025-1	2.08	0.28	0.30	0.08
AS-DX-028-1	1.31	0.13	0.42	0.25
AS-DX-029-1	1.55	0.45	0.83	0.44
AS-DX-030-1	0.69	0.08	0.33	0.17
AS-DX-033-1	1.28	0.06	0.52	0.05
AS-DX-038-1	1.52	0.04	0.37	0.14
AS-DX-041-1	1.04	0.03	0.09	0.03
AS-DX-048-1	0.66	0.03	0.35	0.09
AS-DX-050-1	0.87	0.16	0.18	0.09
AS-DX-051-1	0.90	0.07	0.81	0.16
AS-DX-052-1	1.21	0.07	0.41	0.07
AS-DX-056-1	0.67	0.05	0.51	0.13
AS-DX-059-1	1.04	0.04	1.24	0.30
AS-DX-023-2	1.28	0.38	0.92	0.81
AS-DX-023-3	1.54	0.19	1.73	0.19
AS-DX-027-2	1.21	0.11	0.31	0.15
AS-DX-027-4	0.78	0.12	0.18	0.09
AS-DX-104-1	0.63	0.10	0.63	0.42
AS-DX-033-3	0.47	0.05	0.09	0.01
AS-DX-105-1	0.58	0.09	0.24	0.03
AS-DX-050-4	0.73	0.14	1.00	0.37
AS-DX-109-1	0.61	0.09	0.44	0.26
AS-DX-112-1	0.84	0.14	0.30	0.24
AS-DX-113-1	0.55	0.03	0.25	0.10

AS-DX-038-1	0.06	0.00
AS-DX-040-1	0.06	0.01
AS-DX-041-1	0.07	0.00
AS-DX-043-1	0.09	0.00
AS-DX-044-1	0.07	0.00
AS-DX-045-1	0.07	0.01
AS-DX-046-1	0.06	0.00
AS-DX-018-2	0.22	0.06
AS-DX-048-1	0.12	0.02
AS-DX-049-1	0.08	0.00
AS-DX-050-1	0.08	0.02
AS-DX-051-1	0.07	0.01
AS-DX-052-1	0.07	0.00
AS-DX-053-1	0.18	0.08
AS-DX-054-1	0.08	0.01
AS-DX-055-1	0.08	0.00
AS-DX-056-1	0.08	0.02
AS-DX-057-1	0.09	0.02
AS-DX-058-1	0.06	0.01
AS-DX-059-1	0.06	0.00
AS-DX-023-2	0.05	0.00
AS-DX-023-3	0.20	0.19
AS-DX-098-1	0.06	0.00
AS-DX-027-2	0.07	0.01
AS-DX-027-3	0.08	0.00
AS-DX-027-4	0.23	0.17
AS-DX-100-1	0.40	0.30
AS-DX-101-1	0.27	0.22
AS-DX-094-1	0.17	0.09
AS-DX-104-1	0.06	0.02
AS-DX-033-2	0.15	0.09
AS-DX-033-3	0.03	0.00
AS-DX-105-1	0.14	0.08
AS-DX-106-1	0.16	0.07
AS-DX-107-1	0.06	N/A
AS-DX-108-1	0.09	0.01
AS-DX-050-2	0.06	0.02
AS-DX-050-3	0.25	0.28
AS-DX-050-4	0.05	0.00
AS-DX-109-1	0.05	0.00
AS-DX-007-3	0.12	0.04
AS-DX-111-1	0.08	0.02
AS-DX-059-2	0.06	0.02
AS-DX-112-1	0.08	0.02
AS-DX-113-1	0.33	0.22

[166] Con referencia a la **Tabla 8**, esta tabla muestra los valores de LD-50 en células hepáticas HepG2 para ASO dirigidos a DUX4. Se cultivaron células HEPG2 (HB-8065, ATCC, Manassas, VA) en DMEM (10-013-CV, Corning Inc.) suplementado con FBS al 10% (FBS, 16000044, Thermo Fisher Scientific) y penicilina-estreptomicina 1X (15140122, Thermo Fisher Scientific) Las células se cultivaron a 37°C con 5% de CO₂ en una incubadora humidificada. En placas de 96 pocillos se sembraron 5000 células en 180 µl de medio sin antibióticos. Inmediatamente después de la siembra, las células se transfectan usando el reactivo de transfección Lipofectamine™ RNAiMAX (13778075, Thermo Fisher Scientific). Para la transfección 100 nM de ASO, se diluyen 0.4 µl/pocillo de RNAiMAX en 10 µl de Opti-MEM y luego se combinan con 10 µl de ASO 1 µM (volumen de cultivo final 10x) en Opti-MEM y se incuban a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se crean dosis más bajas de ASO mediante diluciones en serie 1:2 de complejos 100 nM. Se preparan concentraciones más altas aumentando la concentración de los ASO pero manteniendo 0.4 µl/pocillo de RNAiMAX, que es la dosis más alta que se puede usar sin causar citotoxicidad. Luego se añaden veinte µl de complejos ASO/RNAiMAX diluidos apropiados a cada pocillo dentro de los 30 minutos posteriores a la formación del complejo. Las placas se oscilaron suavemente para distribuir uniformemente los reactivos de transfección en el pocillo y luego se devolvieron a la incubadora. Las células se tratan durante 72 - 96 h a 37 °C. Después del tratamiento, se retira el medio de transfección y se añaden 100 µl de medio nuevo a cada pocillo y se realiza el ensayo de WST-8 para medir la viabilidad celular/recuento de células. Las mediciones de viabilidad celular siguieron el protocolo del fabricante. Brevemente, se añadieron 10 µl de WST-8 (ab228554, Abcam) a cada pocillo y la placa se osciló para distribuir el reactivo de manera uniforme. Luego las placas se devolvieron a la incubadora durante 90 min. A continuación se midió la absorbancia a 460 nm en un Cytation 5. Los datos se analizaron restando las mediciones de viabilidad celular de fondo promedio de los pocillos exentos de células (pocillos solo con medio y reactivo WST8 en ellos) de los pocillos que contienen células. La viabilidad celular se calcula por normalización respecto a los pocillos que se transfectan de forma simulada solo con Opti-mem. Los valores de concentración de la dosis letal 50 (LD50) se extrapolan a partir de curvas de dosis usando una macro de Excel personalizada diseñada para este propósito.

Tabla 8: Valores de dosis letal 50 en células hepáticas HepG2 para ASO dirigidos a DUX4.			
Nombre de ASO	IC50	Nombre de ASO	IC50
ASO Con. Neg.	>300	AS-DX-059-1	283.17
AS-DX-007-1	>300	AS-DX-027-2	38.66
AS-DX-015-1	>300	AS-DX-027-4	38.91
AS-DX-015-3	153.17	AS-DX-100-1	96.77
AS-DX-018-1	67.84	AS-DX-033-2	177.65
AS-DX-023-1	31.11	AS-DX-033-3	52.43
AS-DX-025-1	53.00	AS-DX-105-1	51.96
AS-DX-027-1	10.30	AS-DX-106-1	60.38
AS-DX-028-1	50.22	AS-DX-107-1	88.52
AS-DX-029-1	42.15	AS-DX-108-1	112.89
AS-DX-030-1	>300	AS-DX-050-2	113.08
AS-DX-033-1	53.84	AS-DX-050-3	>300
AS-DX-038-1	>300	AS-DX-050-4	>300
AS-DX-040-1	68.18	AS-DX-109-1	105.82
AS-DX-041-1	40.99	AS-DX-007-3	>300
AS-DX-050-1	96.11	AS-DX-111-1	>300
AS-DX-052-1	>300	AS-DX-059-2	>300
AS-DX-057-1	42.42	AS-DX-112-1	>300
AS-DX-058-1	14.50	AS-DX-059-3	>300

[167] Haciendo referencia a la **FIG. 9**, esta figura muestra la reducción de expresión simultánea de transcritos de ARN de DUX4 y DBET en mioblastos de pacientes con FSHD mediante oligonucleótidos antisentido (ASO) multidirigidos. AS-DX-10 solo se dirige al transcrito de DUX4, mientras que AS-DX-25, -37 y -55 se dirigen tanto a los transcritos de DUX4 como de DBET. Se sembraron células de mioblastos de 15Abic inmortalizadas en placas de 12 pocillos y al día siguiente se transfectaron con ASO de control o dirigidos 50 nM usando el agente de transfección RNAiMAX. Un día después de la siembra, se añadieron medios de diferenciación para inducir la formación de mioblastos y la expresión

de DUX4. 72 horas después de la transfección, las células se lisaron y se recogió el ARN total de los pocillos y se realizó la RT-qPCR para determinar la expresión de los transcritos de DUX4 o DBET. Los ASO AS-DX-25, -37 y -55 reducen la expresión de los transcritos DUX4 y DBET, mientras que AS-DX-10 solo reduce la expresión de DUX4.

EJEMPLO 4: Análisis y validación de MC-DX4 fuera de la diana para secuencias diana de ASO

Identificación de transcritos fuera de la diana

[168] Todas las posibles posiciones de ASO complementarias inversas en el gen que codifica DUX4 (ENSG00000258389.2), de 15 pb a 20 pb se generaron con un desplazamiento de 1 pb en la secuencia de referencia a lo largo de la región de DUX4 chr4:190 173 774-190 185 942. Se usó un script modificado de GGGenome (<https://gggenome.dbcls.jp/>) para el alineamiento rápido de las secuencias de oligonucleótidos de los autores de la invención con el transcriptoma humano (Human RNA Refseq versión 205, marzo de 2021). Este script identificó todas las transcritos que son parcialmente complementarias a cada posible ASO dirigido a DUX4. Luego se analizaron estos aciertos con algoritmos para identificar sitios fuera de la diana más probables. Estos pueden contener hasta 3 emparejamientos erróneos, huecos o protuberancias (publicación internacional W02021203043), pero deben obedecer una serie de otros principios relacionados con la conformación estructural, afinidad y expresión del transcrito. Incluso con estos filtros todavía hay muchos transcritos fuera de la diana previstos que probablemente sean falsos positivos o dependientes del contexto, y deben validarse mediante ensayos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

Filtrado de interacciones fuera de la diana para posibles dianas positivas relacionadas con FSHD

[169] La separación de pacientes y el análisis de la expresión génica son partes fundamentales de la estrategia de análisis de datos descrita para comprender la biología de la enfermedad. Esto comienza con la recopilación de conjuntos de datos disponibles de la bibliografía que describe patrones de expresión de ARN de tejidos musculares y células de pacientes. Los autores de la invención montaron una base de datos de 10 estudios con estándares rigurosos para la manipulación de muestras, perfiles transcriptómicos por micromatrices y RNAseq, e información importante de los pacientes. Estos 10 estudios incluyen: Genes con mayor expresión en mioblastos que sobreexpresan DUX4 (Tsumagari et al. 2011(31), Pakula et al. 2013, (32) Geng et al. 2012 (33), y Mitsuhashi et al. 2021 (34)); Estudios de micromatrices para biopsias de músculos humanos (Winokur et al. 2003 (35) y Rahimov et al. 2012 (36));

y perfiles de RNA-seq (Yao et al. 2014 (28), Wong et al. 2020 (17) y Wang et al. 2019 (29)). Una desventaja de estos estudios es que a menudo contienen un número bajo de pacientes careciendo de potencia estadística. Para superar este problema, los autores de la invención crearon un nuevo conjunto de datos a partir de los tres estudios de RNA-seq con datos disponibles para mejorar la potencia estadística y la capacidad de derivar correlaciones con los atributos clínicos de los pacientes. La **FIG. 10** muestra una descripción general de los conjuntos de datos y el análisis de los autores de la invención.

[170] Primero, los autores de la invención identificaron los genes que estaban comúnmente regulados por aumento en el músculo de FSHD frente al músculo de control entre los conjuntos de datos publicados o usando el análisis de secuencia de ARN de los propios autores de la invención. Los autores de la invención también usaron análisis de componentes principales y agrupamiento jerárquico para separar los pacientes en grupos y compararon patrones de expresión entre las muestras de control y estos grupos. Es interesante que las agrupaciones se alinean bien con las puntuaciones de gravedad clínica (es decir, enfermedades leves, moderadas o graves). Para respaldar este análisis, se obtuvieron resultados similares de un análisis similar de un subconjunto de las muestras incluidas en el metaanálisis más amplio, como se muestra en la **FIG. 11**. A partir de este análisis, los autores de la invención crearon una base de datos de genes regulados por aumento en la FSHD manteniendo con cada gen la evidencia que respalda esta desregulación y cualquier correlación clínica asociada. A partir de esta base de datos, los autores de la invención realizaron a continuación un análisis de enriquecimiento de rutas usando el análisis de rutas GO (37). Las rutas reguladas por aumento superiores incluyen la respuesta inflamatoria y otras rutas inmunorreguladas, proliferación celular, regulación del ciclo celular y fibrosis.

[171] Una vez montada esta base de datos de genes y rutas relacionados con la FSHD, se filtró la posible interacción fuera de la diana identificada contra esta lista. Las posibles interacciones fuera de la diana que coinciden con un gen relacionado con FSHD, o codianas, se presentan en la columna más a la derecha en la **Tabla 2**. Por ejemplo, se prevé que AS-DX-007 se dirija a tres codianas asociadas con FSHD, DBET, MKI67 e IRF5. DBET es un ARN no codificante asociado con la apertura de las repeticiones D4Z4 y la expresión de DUX4 (38). MKI67 codifica la proteína Ki-67, que se detectó en el tejido muscular de FSHD regulada por aumento, y puede estar implicada en la inducción por DUX4 de la proliferación y daño de las células de fibras musculares (**FIG. 12A**). IRF5 (factor regulador de interferón 5) codifica un factor de transcripción que está regulado por aumento por varias señales inflamatorias y da como resultado la expresión de varias citoquinas tales como TNF y la

inducción de la respuesta de interferón intracelular (**FIG. 12B**). Este análisis también demostró una mayor expresión de estos genes en la FSHD leve y grave (**FIG. 13**).

Filtrado de interacciones fuera de la diana para posibles interacciones negativas relacionadas con la toxicidad

[172] Para identificar posibles interacciones fuera de la diana que pueden estar asociadas con la toxicidad que sería deseable evitar, los autores de la invención usaron la base de datos de conocimientos Ingenuity que almacena publicaciones revisadas por pares y conjuntos de datos de expresión génica relacionados con la toxicidad de Tox Net y otras bases de datos para asociar genes fuera de la diana con posible toxicidad. Los autores de la invención también identificaron genes relacionados con la diferenciación, desarrollo y función muscular por el análisis de rutas Go. Los autores de la invención filtraron secuencias de oligonucleótidos que identificaban interacciones fuera de la diana para coincidencias con la base de conocimiento de toxicidad de IPA o rutas de Go. Por ejemplo, NR4A1 está asociado con la muerte de células hepáticas y renales y fibrosis, y con la diferenciación de las células musculares.

Validación de la interacción de codianas por qRT-PCR

[173] Para validar las interacciones fuera de la diana, se usó la línea de mioblastos de FSHD 15Abic. Se sembraron 2.5e5 mioblastos 15Abic en placas de 6 pocillos. Después de 24 horas, se eliminó el medio de replicación y se añadieron 2 ml de medio de diferenciación y 250 µl de complejos que contenían ASO RNAimax apropiado óptimos, de modo que la concentración final de cada ASO fuera 50 nM. Los tratamientos con ASO incluyeron el ASO de control negativo fluorescente, AS-DX-015-1, que solo se dirige a DUX4 como control positivo, o AS-DX-007-1 o AS-DX-050-1, que pueden codirigirse a DBET, IRF5 y MKI67. Al inicio de la transfección, se añadió el medio de diferenciación a las células para inducir la fusión en miotubos y la expresión de DUX4. Haciendo referencia a la **FIG. 14A** presenta una eficiencia de transfección cercana a 100% del ASO fluorescente en condiciones optimizadas 48 horas después de la transfección. Después de 96 horas de la transfección, se observó la fusión de miotubos por la morfología celular y se recogió el ARN total. Se creó ADNc y se realizó la qRT-PCR para DUX4 y los genes codiana. Haciendo referencia a la **FIG. 14B** el gráfico presenta la media de tres pocillos biológicos de repetición y las barras de error representan el error estándar de la media. * indica un valor p de <0.05 según la prueba t de Student bilateral. Se observó una reducción de la expresión de DUX4 robusta

para todos los ASO, y una reducción de la expresión significativa de las codianas con AS-DX-007-1 y AS-DX-050-1.

[174] Aunque en el presente documento se han mostrado y descrito aspectos preferidos de la presente descripción, dichos aspectos se proporcionan únicamente a modo de ejemplo. Pueden ocurrir numerosas variaciones, cambios y sustituciones. Debe entenderse que se pueden emplear varias alternativas a los aspectos de la descripción descritos en el presente documento en la práctica de la descripción. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la descripción y que los métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes queden cubiertos por las mismas.

REFERENCIAS

1. Hamel J, Tawil R. Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy: Update on Pathogenesis and Future Treatments. *Neurotherapeutics*. 2018;15(4):863-71. doi: 10.1007/s13311-018-00675-3. PubMed PMID: 30361930; PMCID: PMC6277282.
2. Do TN, Street N, Donnelly J, Adams MM, Cunniff C, Fox DJ, Weinert RO, Oleszek J, Romitti PA, Westfield CP, Bolen J, Muscular Dystrophy Surveillance T, Research N. Muscular Dystrophy Surveillance, Tracking, and Research Network pilot: Population-based surveillance of major muscular dystrophies at four U.S. sites, 2007-2011. *Birth Defects Res*. 2018;110(19):1404-11. doi: 10.1002/bdr2.1371. PubMed PMID: 30070776; PMCID: PMC6265066.
3. Richards M, Coppee F, Thomas N, Belayew A, Upadhyaya M. Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): an enigma unravelled? *Hum Genet*. 2012;131(3):325-40. doi: 10.1007/s00439-011-1100-z. PubMed PMID: 21984394.
4. Kowaljow V, Marcowycz A, Anseau E, Conde CB, Sauvage S, Matteotti C, Arias C, Corona ED, Nunez NG, Leo O, Wattiez R, Figlewicz D, Laoudj-Chenivesse D, Belayew A, Coppee F, Rosa AL. The DUX4 gene at the FSHD1A locus encodes a pro-apoptotic protein. *Neuromuscul Disord*. 2007;17(8):611-23. doi: 10.1016/j.nmd.2007.04.002. PubMed PMID: 17588759.
5. Celegato B, Capitanio D, Pescatori M, Romualdi C, Pacchioni B, Cagnin S, Vigano A, Colantoni L, Begum S, Ricci E, Wait R, Lanfranchi G, Gelfi C. Parallel protein and transcript profiles of FSHD patient muscles correlate to the D4Z4 arrangement and reveal a common impairment of slow to fast fibre differentiation and a general deregulation of MyoD-dependent genes. *Proteomics*. 2006;6(19):5303-21. doi: 10.1002/pmic.200600056. PubMed PMID: 17013991.

6. A prospective, quantitative study of the natural history of facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD): implications for therapeutic trials. The FSH-DY Group. *Neurology*. 1997;48(1):38-46. doi: 10.1212/wnl.48.1.38. PubMed PMID: 9008491.
7. Tawil R, Forrester J, Griggs RC, Mendell J, Kissel J, McDermott M, King W, Weiffenbach B, Figlewicz D. Evidence for anticipation and association of deletion size with severity in facioscapulohumeral muscular dystrophy. The FSH-DY Group. *Ann Neurol*. 1996;39(6):744-8. doi: 10.1002/ana.410390610. PubMed PMID: 8651646.
8. Mah JK, Chen YW. A Pediatric Review of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy. *J Pediatr Neurol*. 2018;16(4):222-31. doi: 10.1055/s-0037-1604197. PubMed PMID: 30923442; PMCID: PMC6435288.
9. Padberg GW, Brouwer OF, de Keizer RJ, Dijkman G, Wijmenga C, Grote JJ, Frants RR. On the significance of retinal vascular disease and hearing loss in facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Muscle Nerve Suppl*. 1995(2):S73-80. PubMed PMID: 23573590.
10. Anseau E, Vanderplanck C, Wauters A, Harper SQ, Coppee F, Belayew A. Antisense Oligonucleotides Used to Target the DUX4 mRNA as Therapeutic Approaches in Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy (FSHD). *Genes (Basel)*. 2017;8(3). doi: 10.3390/genes8030093. PubMed PMID: 28273791; PMCID: PMC5368697.
11. Bao B, Maruyama R, Yokota T. Targeting mRNA for the treatment of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Intractable Rare Dis Res*. 2016;5(3):168-76. doi: 10.5582/iridr.2016.01056. PubMed PMID: 27672539; PMCID: PMC4995414.
12. Wallace LM, Garwick SE, Mei W, Belayew A, Coppee F, Ladner KJ, Guttridge D, Yang J, Harper SQ. DUX4, a candidate gene for facioscapulohumeral muscular dystrophy, causes p53-dependent myopathy in vivo. *Ann Neurol*. 2011;69(3):540-52. doi: 10.1002/ana.22275. PubMed PMID: 21446026; PMCID: PMC4098764.
13. Chen JC, King OD, Zhang Y, Clayton NP, Spencer C, Wentworth BM, Emerson CP, Jr., Wagner KR. Morpholino-mediated Knockdown of DUX4 Toward Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy Therapeutics. *Mol Ther*. 2016;24(8):1405-11. doi: 10.1038/mt.2016.111. PubMed PMID: 27378237; PMCID: PMC5023379.
14. Wallace LM, Saad NY, Pyne NK, Fowler AM, Eidahl JO, Domire JS, Griffin DA, Herman AC, Sahenk Z, Rodino-Klapac LR, Harper SQ. Pre-clinical Safety and Off-Target Studies to Support Translation of AAV-Mediated RNAi Therapy for FSHD. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018;8:121-30. doi: 10.1016/j.omtm.2017.12.005. PubMed PMID: 29387734; PMCID: PMC5787672.

15. Wallace LM, Liu J, Domire JS, Garwick-Coppens SE, Guckes SM, Mendell JR, Flanigan KM, Harper SQ. RNA interference inhibits DUX4-induced muscle toxicity in vivo: implications for a targeted FSHD therapy. *Mol Ther*. 2012;20(7):1417-23. doi: 10.1038/mt.2012.68. PubMed PMID: 22508491; PMCID: PMC3392971.
16. Pandey SN, Lee YC, Yokota T, Chen YW. Morpholino treatment improves muscle function and pathology of Pitx1 transgenic mice. *Mol Ther*. 2014;22(2):390-6. doi: 10.1038/mt.2013.263. PubMed PMID: 24232919; PMCID: PMC3916049.
17. Wong CJ, Wang LH, Friedman SD, Shaw D, Campbell AE, Budech CB, Lewis LM, Lemmers R, Statland JM, van der Maarel SM, Tawil RN, Tapscott SJ. Longitudinal measures of RNA expression and disease activity in FSHD muscle biopsies. *Hum Mol Genet*. 2020;29(6):1030-43. doi: 10.1093/hmg/ddaa031. PubMed PMID: 32083293; PMCID: PMC7158378.
18. Xie S, Xiang Y, Wang X, Ren H, Yin T, Ren J, Liu W. Acquired cholesteatoma epithelial hyperproliferation: Roles of cell proliferation signal pathways. *Laryngoscope*. 2016;126(8):1923-30. doi: 10.1002/lary.25834. PubMed PMID: 26989841.
19. Elkon KB, Briggs TA. The (Orf)ull truth about IRF5 and type I interferons in SLE. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(10):543-4. doi: 10.1038/s41584-020-0472-7. PubMed PMID: 32709997.
20. S.T. C. Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications, Second Edition 2008.
21. Reinert K, Langmead B, Weese D, Evers DJ. Alignment of Next-Generation Sequencing Reads. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2015;16:133-51. doi: 10.1146/annurev-genom-090413-025358. PubMed PMID: 25939052.
22. van der Maarel SM, Frants RR. The D4Z4 repeat-mediated pathogenesis of facioscapulohumeral muscular dystrophy. *Am J Hum Genet*. 2005;76(3):375-86. doi: 10.1086/428361. PubMed PMID: 15674778; PMCID: PMC1196390.
23. Ballarati L, Piccini I, Carbone L, Archidiacono N, Rollier A, Marozzi A, Meneveri R, Ginelli E. Human genome dispersal and evolution of 4q35 duplications and interspersed LSau repeats. *Gene*. 2002;296(1-2):21-7. doi: 10.1016/s0378-1119(02)00858-2. PubMed PMID: 12383499.
24. Das S, Chadwick BP. Influence of Repressive Histone and DNA Methylation upon D4Z4 Transcription in Non-Myogenic Cells. *PLoS One*. 2016;11(7):e0160022. doi: 10.1371/journal.pone.0160022. PubMed PMID: 27467759; PMCID: PMC4965136.

25. Snider L, Asawachaicharn A, Tyler AE, Geng LN, Petek LM, Maves L, Miller DG, Lemmers RJ, Winokur ST, Tawil R, van der Maarel SM, Filippova GN, Tapscott SJ. RNA transcripts, miRNA-sized fragments and proteins produced from D4Z4 units: new candidates for the pathophysiology of facioscapulohumeral dystrophy. *Hum Mol Genet.* 2009;18(13):2414-30. doi: 10.1093/hmg/ddp180. PubMed PMID: 19359275; PMCID: PMC2694690.
26. Hagedorn PH, Pontoppidan M, Bisgaard TS, Berrera M, Dieckmann A, Ebeling M, Moller MR, Hudlebusch H, Jensen ML, Hansen HF, Koch T, Lindow M. Identifying and avoiding off-target effects of RNase H-dependent antisense oligonucleotides in mice. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(11):5366-80. doi: 10.1093/nar/gky397. PubMed PMID: 29790953; PMCID: PMC6009603.
27. Scharner J, Ma WK, Zhang Q, Lin KT, Rigo F, Bennett CF, Krainer AR. Hybridization-mediated off-target effects of splice-switching antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(2):802-16. doi: 10.1093/nar/gkz1132. PubMed PMID: 31802121; PMCID: PMC6954394.
28. Yao Z, Snider L, Balog J, Lemmers RJ, Van Der Maarel SM, Tawil R, Tapscott SJ. DUX4-induced gene expression is the major molecular signature in FSHD skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 2014;23(20):5342-52. doi: 10.1093/hmg/ddu251. PubMed PMID: 24861551; PMCID: PMC4168822.
29. Wang LH, Friedman SD, Shaw D, Snider L, Wong CJ, Budech CB, Poliachik SL, Gove NE, Lewis LM, Campbell AE, Lemmers R, Maarel SM, Tapscott SJ, Tawil RN. MRI-informed muscle biopsies correlate MRI with pathology and DUX4 target gene expression in FSHD. *Hum Mol Genet.* 2019;28(3):476-86. doi: 10.1093/hmg/ddy364. PubMed PMID: 30312408; PMCID: PMC6337697.
30. Consortium GT. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet.* 2013;45(6):580-5. doi: 10.1038/ng.2653. PubMed PMID: 23715323; PMCID: PMC4010069.
31. Tsumagari K, Chang SC, Lacey M, Baribault C, Chittur SV, Sowden J, Tawil R, Crawford GE, Ehrlich M. Gene expression during normal and FSHD myogenesis. *BMC Med Genomics.* 2011;4:67. doi: 10.1186/1755-8794-4-67. PubMed PMID: 21951698; PMCID: PMC3204225.
32. Pakula A, Schneider J, Janke J, Zacharias U, Schulz H, Hubner N, Mahler A, Spuler A, Spuler S, Carlier P, Boschmann M. Altered expression of cyclin A 1 in muscle of patients with facioscapulohumeral muscle dystrophy (FSHD-1). *PLoS One.* 2013;8(9):e73573. doi: 10.1371/journal.pone.0073573. PubMed PMID: 24019929; PMCID: PMC3760810.

33. Geng LN, Yao Z, Snider L, Fong AP, Cech JN, Young JM, van der Maarel SM, Ruzzo WL, Gentleman RC, Tawil R, Tapscott SJ. DUX4 activates germline genes, retroelements, and immune mediators: implications for facioscapulohumeral dystrophy. *Dev Cell*. 2012;22(1):38-51. doi: 10.1016/j.devcel.2011.11.013. PubMed PMID: 22209328; PMCID: PMC3264808.
34. Mitsuhashi S, Nakagawa S, Sasaki-Honda M, Sakurai H, Frith MC, Mitsuhashi H. Nanopore direct RNA sequencing detects DUX4-activated repeats and isoforms in human muscle cells. *Hum Mol Genet*. 2021;30(7):552-63. doi: 10.1093/hmg/ddab063. PubMed PMID: 33693705; PMCID: PMC8120133.
35. Winokur ST, Chen YW, Masny PS, Martin JH, Ehmsen JT, Tapscott SJ, van der Maarel SM, Hayashi Y, Flanigan KM. Expression profiling of FSHD muscle supports a defect in specific stages of myogenic differentiation. *Hum Mol Genet*. 2003;12(22):2895-907. doi: 10.1093/hmg/ddg327. PubMed PMID: 14519683.
36. Rahimov F, King OD, Leung DG, Bibat GM, Emerson CP, Jr., Kunkel LM, Wagner KR. Transcriptional profiling in facioscapulohumeral muscular dystrophy to identify candidate biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(40):16234-9. doi: 10.1073/pnas.1209508109. PubMed PMID: 22988124; PMCID: PMC3479603.
37. Gene Ontology C. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D1049-56. doi: 10.1093/nar/gku1179. PubMed PMID: 25428369; PMCID: PMC4383973.
38. Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y, Gabellini D. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell*. 2012;149(4):819-31. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.035. PubMed PMID: 22541069; PMCID: PMC3350859.
39. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012 Aug;40(15):e115. doi: 10.1093/nar/gks596. Epub 2012 Jun 22. PMID: 22730293; PMCID: PMC3424584.
40. SantaLucia J Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 17;95(4):1460-5. doi: 10.1073/pnas.95.4.1460. PMID: 9465037; PMCID: PMC19045.
41. Owczarzy R, You Y, Moreira BG, Manthey JA, Huang L, Behlke MA, Walder JA. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting

temperatures. *Biochemistry*. 2004 Mar 30;43(12):3537-54. doi: 10.1021/bi034621r. PMID: 15035624.