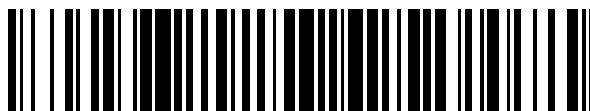


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 420 914**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2003 E 03789763 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1569695**

54 Título: **Modulación antisentido de la expresión de la apolipoproteína B**

30 Prioridad:

13.11.2002 US 426234 P
15.05.2003 WO PCT/US03/15493

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.08.2013

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US

72 Inventor/es:

CROOKE, ROSANNE;
GRAHAM, MARK;
LEMONIDIS-TARBET, KRISTINA;
DOBIE, KENNETH, W. y
FREIER, SUSAN M.

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 420 914 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación antisentido de la expresión de la apolipoproteína B

Campo De La Invención

- 5 La presente invención proporciona composiciones y métodos para modular la expresión de la apolipoproteína B. Esta invención se refiere a oligonucleótidos que pueden hibridar específicamente con ácidos nucleicos que codifican la apolipoproteína B. Se ha mostrado que dichos compuestos modulan la expresión de la apolipoproteína B.

Antecedentes De La Invención

- 10 Las lipoproteínas son partículas globulares de tipo micela que consisten en un núcleo no polar de acilglicerol y ésteres de colesterol rodeado de un recubrimiento anfifílico de proteína, fosfolípidos y colesterol. Las lipoproteínas se han clasificado en 5 amplias categorías basándose en sus propiedades funcionales y físicas: quilomicrones, que transportan lípidos de la dieta del intestino a los tejidos; lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); lipoproteínas de densidad intermedia (IDL); lipoproteínas de baja densidad (LDL); todas ellas transportan triacilglicerol y colesterol desde el hígado a los tejidos; y las lipoproteínas de alta densidad (HDL), que transportan el colesterol endógeno desde los tejidos al hígado.

- 15 Las partículas de lipoproteínas experimentan un procesamiento metabólico continuo y tienen propiedades y composiciones variables. Las densidades de las lipoproteínas aumentan sin disminuir el diámetro de la partícula debido a que la densidad de los recubrimientos exteriores es menor que la del núcleo interior. Los componentes proteicos de las lipoproteínas se conocen como apolipoproteínas. Al menos 9 apolipoproteínas están distribuidas en cantidades significativas entre las diferentes lipoproteínas humanas.

- 20 La apolipoproteína B (también conocida como ApoB, apolipoproteína B-100; ApoB-100, apolipoproteína B-48; ApoB-48 y antígeno Ag(x)), es una glicoproteína grande que tiene una función indispensable en el ensamblaje y la secreción de lípidos y en el transporte y la captación mediada por receptor, y la entrega de distintas clases de lipoproteínas. La importancia de la apolipoproteína B se extiende a una variedad de funciones, desde la absorción y el procesamiento de los lípidos de la dieta a la regulación de los niveles de lipoproteínas circulantes (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193). Esta última propiedad está en la base de su importancia en términos de susceptibilidad a la aterosclerosis, que se correlaciona mucho con la concentración ambiente de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193).

- 30 En los mamíferos existen dos formas de apolipoproteína B. La ApoB-100 representa la proteína de longitud completa que contiene 4536 restos de aminoácidos, sintetizada exclusivamente en el hígado humano (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193). Una forma truncada, conocida como apoB-48, es colineal con los 2152 restos de aminoácidos terminales y se sintetiza en el intestino delgado de todos los mamíferos (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193).

- 35 La apoB-100 es el principal componente proteico de LDL y contiene el dominio necesario para la interacción de esta especie de lipoproteína con el receptor de LDL. Además, la apoB-100 contiene un resto de cisteína no emparejado que media la interacción con la apolipoproteína (a) y genera otra lipoproteína distinta aterogénica llamada lipoproteína Lp(a) (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193).

- 40 En los seres humanos, la apoB-48 circula asociada con los quilomicrones y los restos de quilomicrones y estas partículas son eliminadas por un receptor distinto conocido como proteína relacionada con el receptor de LDL (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193). La apoB-48 se puede considerar como una adaptación crucial por la cual el lípido de la dieta es suministrado desde el intestino delgado al hígado, mientras que la apoB-100 participa en el transporte y el suministro de colesterol plasmático endógeno (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193).

- 45 La base por la cual el gen estructural común de la apolipoproteína B produce dos isoformas de proteína distintas es un proceso conocido como edición del ARN. Un sitio específico de reacción de edición de citosina en uracilo produce un codón de parada UAA y terminación de la traducción de la apolipoproteína B para producir ApoB-48 (Davidson y Shelness, *Annu. Rev. Nutr.*, 2000, 20, 169-193).

La apolipoproteína B se clonó en 1985 (Law et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1985, 82, 8340-8344) y se cartografió en el cromosoma 2p23-2p24 en 1986 (Deeb et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1986, 83, 419-422).

- 50 En la patente de EE.UU. 5.786.206 se describen y reivindican métodos y composiciones para determinar el nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el plasma que incluye secuencias de ADN aisladas que codifican regiones del epítipo de la apolipoproteína B-100 (Smith et al., 1998).

Se encontró que ratones transgénicos que expresan la apolipoproteína B humana y alimentados con una dieta alta en grasa, desarrollaban niveles altos de colesterol en el plasma y presentaban un aumento de 11 veces de las

lesiones ateroescleróticas frente a las crías de la misma camada no transgénicas (Kim y Young, *J. Lipid Res.*, 1998, 39, 703-723; Nishina et al., *J. Lipid Res.*, 1990, 31, 859-869).

Además, los ratones transgénicos que expresan formas truncadas de la apolipoproteína B se han usado para identificar las características estructurales carboxilo terminales de la ApoB-100 que son necesarias para las interacciones con la apolipoproteína(a) para generar la partícula de lipoproteína Lp(a) e investigar características estructurales de la región de unión al receptor de LDL de la ApoB-100 (Kim y Young, *J. Lipid Res.*, 1998, 39, 703-723; McCormick et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 23616-23622).

Se han generado ratones con el gen de la apolipoproteína B desactivado (que llevan alteraciones tanto en la ApoB-100 como la ApoB-48) que están protegidos frente al desarrollo de hipercolesterolemia cuando se alimentan con una dieta alta en grasa (Farese et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995, 92, 1774-1778; Kim y Young, *J. Lipid Res.*, 1998, 39, 703-723). La incidencia de la aterosclerosis se ha investigado en ratones que expresan exclusivamente ApoB-100 o ApoB-48 y se encontró que la susceptibilidad a la aterosclerosis dependía de los niveles totales de colesterol. El que los ratones sintetizaran ApoB-100 o ApoB-48 no afectaba a la extensión de la aterosclerosis, indicando que probablemente no hay una diferencia importante en la aterogenicidad intrínseca de la ApoB-100 frente a la ApoB-48 (Kim y Young, *J. Lipid Res.*, 1998, 39, 703-723; Veniant et al., *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 180-188).

Niveles plasmáticos elevados de lipoproteína Lp(a) que contiene apoB-100, están asociados con un mayor riesgo de aterosclerosis y sus manifestaciones, que pueden incluir la hipercolesterolemia (Seed et al., *N. Engl. J. Med.*, 1990, 322, 1494-1499), infarto de miocardio (Sandkamp et al., *Clin. Chem.*, 1990, 36, 20-23) y trombosis (Nowak-Gottl et al., *Pediatrics*, 1997, 99, E11).

En la concentración plasmática de Lp(a) influye mucho los factores hereditarios y es refractaria a la mayoría de los fármacos y a la manipulación de la dieta (Katan y Beynen, *Am. J. Epidemiol.*, 1987, 125, 387-399; Vessby et al., *Atherosclerosis*, 1982, 44, 61-71). La terapia farmacológica de los niveles de Lp(a) elevados ha tenido un éxito solo moderado y la aféresis sigue siendo la modalidad terapéutica más eficaz (Hajjar y Nachman, *Annu. Rev. Med.*, 1996, 47, 423-442).

En la patente de EE.UU. 6.156.315 y la correspondiente publicación PCT WO 99/18986 se describe y reivindica un método para inhibir la unión del LDL a la matriz de los vasos sanguíneos en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento del mismo, que es capaz de unirse a la región amino terminal de la apolipoproteína B, inhibiendo así la unión de la lipoproteína de baja densidad a la matriz de los vasos sanguíneos (Goldberg y Pillarsetti, 2000; Goldberg y Pillarsetti, 1999).

En la patente de EE.UU. 6.096.516 se describen y reivindican vectores que contienen anticuerpos recombinantes murinos que codifican el ADNc que se une a la ApoB-100 humana con el fin de diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Kwak et al., 2000).

En la solicitud de patente europea EP 911344 publicada el 28 de abril, 1999 (y que corresponde a la patente de EE.UU. 6.309.844 se describe y reivindica un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la ApoB-48 y no se une específicamente a la ApoB-100, que es útil para el diagnóstico y la terapia de la hiperlipidemia y la esclerosis arterial (Uchida y Kurano, 1998).

En la publicación PCT WO 01/30354 se describen y reivindican métodos de tratamiento de un paciente con un trastorno cardiovascular, que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto a dicho paciente, en el que dicho compuesto actúa durante un periodo de tiempo para reducir las concentraciones plasmáticas de apolipoproteína B o lipoproteínas que contienen apolipoproteína B estimulando una ruta de degradación de la apolipoproteína B (Fisher y Williams, 2001).

En la patente de EE.UU. 5.220.006 se describe y reivindica una secuencia de ADN que actúa en cis clonada que media la supresión de apolipoproteína B aterogénica (Ross et al., 1993).

En la publicación PCT WO 01/12789 se describe y reivindica un ribozima que escinde el ARNm de ApoB-100 específicamente en la posición 6679 (Chan et al., 2001).

Tang et al., *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 1999, 7(4) describen experimentos que usan oligodesoxinucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B en células hepáticas de rata.

Eggerman et al., *Federal Register*, 2000, 65(110) discuten experimentos que usan oligodesoxinucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B en células hepáticas humanas.

Hasta la fecha, las estrategias dirigidas a inhibir la función de la apolipoproteína B se han limitado a la aféresis de Lp(a), anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y ribozimas. Sin embargo, con excepción de la aféresis de Lp(a), estas estrategias de investigación no se han ensayado como protocolos terapéuticos. Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad desde hace tiempo de agentes adicionales capaces de inhibir de forma eficaz la función de la apolipoproteína B.

Está surgiendo la tecnología antisentido como un medio eficaz de reducir la expresión de productos génicos específicos y por lo tanto puede llegar a ser singularmente útil en una serie de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación que implican la modulación de la expresión de la apolipoproteína B.

- 5 La presente invención proporciona composiciones y métodos para modular la expresión de la apolipoproteína B, incluyendo la inhibición de la isoforma alternativa de la apolipoproteína B, la ApoB-48.

Compendio De La Invención

- 10 La invención proporciona un oligonucleótido antisentido de 12 a 30 bases nucleicas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en donde dicho oligonucleótido es 100% complementario de dicho ácido nucleico e inhibe la expresión de la apolipoproteína B, comprendiendo dicho oligonucleótido al menos 8 bases nucleicas contiguas de SEQ ID NO:247.

La invención proporciona un oligonucleótido antisentido de 20 a 30 bases nucleicas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en donde dicho oligonucleótido hibrida específicamente con dicho ácido nucleico e inhibe la expresión de la apolipoproteína B, en donde el oligonucleótido tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO:247.

- 15 La invención también proporciona una composición que comprende un oligonucleótido antisentido de la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un método para inhibir la expresión de la apolipoproteína B en células o tejidos *ex vivo* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de la invención en condiciones tales que se inhibe la expresión de la apolipoproteína B.

- 20 La invención también proporciona un oligonucleótido antisentido de la invención o una composición de la invención, para usar en la terapia o profilaxis de una enfermedad.

La invención también proporciona un oligonucleótido antisentido de la invención o una composición de la invención, para usar en el tratamiento de la hipercolesterolemia, una enfermedad cardiovascular; hiperlipidemia; diabetes; u obesidad, en un ser humano.

- 25 La invención también proporciona el uso de un oligonucleótido antisentido de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hipercolesterolemia, una enfermedad cardiovascular; hiperlipidemia; diabetes; u obesidad, en un ser humano.

Compendio de la descripción

- 30 La presente descripción se refiere a compuestos, en particular oligonucleótidos antisentido, que están dirigidos a un ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, y que modulan la expresión de la apolipoproteína B. También se describen composiciones farmacéuticas y otras composiciones que comprenden los compuestos de la descripción. Además, se describen métodos para modular la expresión de la apolipoproteína B en células o tejidos, que comprenden poner en contacto dichas células o tejidos con uno o más compuestos antisentido o composiciones de la descripción. Además se describen métodos de tratamiento de un animal, en particular un ser humano, que se sospecha que tiene o es propenso a tener una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B, por administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más compuestos antisentido o composiciones de la descripción.

- 40 En particular, en la presente memoria se describe un compuesto de 8 a 50 bases nucleicas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en el que dicho compuesto hibrida específicamente con e inhibe la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, comprendiendo dicho compuesto al menos 8 bases nucleicas contiguas de cualquiera de las SEQ ID NO: 127-134, 136, 138-174, 176-317, 319-321, 323-333, 335-339, 341-374, 376-416, 418-500, 502-510, 512-804, 815, 816, 819-821, 824, 825, 827, 828, 830, 831, 833-835, 837-839, 842, 843 y 845-854.

- 45 También se describe en la presente memoria un compuesto de 8 a 50 bases nucleicas de longitud, que hibrida específicamente con al menos una parte de 8 bases nucleicas de un sitio activo en una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, comprendiendo dicho compuesto al menos 8 bases nucleicas contiguas de cualquiera de las SEQ ID NO: 127-134, 136, 138-174, 176-317, 319-321, 323-333, 335-339, 341-374, 376-416, 418-500, 502-510, 512-804, 815, 816, 819-821, 824, 825, 827, 828, 830, 831, 833-835, 837-839, 842, 843 y 845-854, siendo dicho sitio activo una región en dicho ácido nucleico, en el que la unión de dicho compuesto a dicho sitio inhibe significativamente la expresión de la apolipoproteína B comparado con un control.

- 50 También se describe en la presente memoria un compuesto de 8 a 50 bases nucleicas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en el que dicho compuesto hibrida específicamente con dicho ácido nucleico e inhibe la expresión de la apolipoproteína B, en el que la apolipoproteína B es codificada por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NO: 3 y (b) y una variante natural del

polinucleótido que codifica la apolipoproteína B que hibrida con el complemento del polinucleótido (a) en condiciones restrictivas, comprendiendo dicho compuesto al menos 8 bases nucleicas contiguas de una cualquiera de las SEQ ID NO: 127-134, 136, 138-174, 176-317, 319-321, 323-333, 335-339, 341-374, 376-416, 418-500, 502-510, 512-804, 815, 816, 819-821, 824, 825, 827, 828, 830, 831, 833-835, 837-839, 842, 843 y 845-854.

- 5 También se describe en la presente memoria un compuesto de 8 a 50 bases nucleicas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en el que dicho compuesto hibrida específicamente con dicho ácido nucleico e inhibe la expresión de la apolipoproteína B, en el que la apolipoproteína B es codificada por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 17, comprendiendo dicho compuesto al menos 8 bases nucleicas contiguas de uno cualquiera de las SEQ ID NO: 127-134, 136, 138-174, 176-317, 319-321, 323-333, 335-339, 341-374, 376-416, 418-500, 502-510, 512-804, 815, 816, 819-821, 824, 825, 827, 828, 830, 831, 833-835, 837-839, 842, 843 y 845-854.

- 10 También se describe en la presente memoria un compuesto de 8 a 50 bases nucleicas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en el que dicho compuesto hibrida específicamente con un sitio activo en dicho ácido nucleico e inhibe la expresión de la apolipoproteína B, comprendiendo dicho compuesto al menos 8 bases nucleicas contiguas de cualquiera de las SEQ ID NO: 127-134, 136, 138-174, 176-317, 319-321, 323-333, 335-339, 341-374, 376-416, 418-500, 502-510, 512-804, 815, 816, 819-821, 824, 825, 827, 828, 830, 831, 833-835, 837-839, 842, 843 y 845-854, siendo dicho sitio activo una región en dicho ácido nucleico, en el que la unión de dicho compuesto a dicho sitio inhibe significativamente la expresión de la apolipoproteína B comparado con un control.

- 15 También se describe en la presente memoria un compuesto mimético de oligonucleótido de 8 a 50 bases nucleicas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en el que dicho compuesto hibrida específicamente con dicho ácido nucleico e inhibe la expresión de la apolipoproteína B, comprendiendo dicho compuesto al menos 8 bases nucleicas contiguas de cualquiera de las SEQ ID NO: 127-134, 136, 138-174, 176-317, 319-321, 323-333, 335-339, 341-374, 376-416, 418-500, 502-510, 512-804, 815, 816, 819-821, 824, 825, 827, 828, 830, 831, 833-835, 837-839, 842, 843 y 845-854.

- 20 También se describe en la presente memoria un compuesto antisentido de 8 a 50 bases nucleicas de longitud, en el que dicho compuesto específicamente hibrida con los nucleótidos 2920-3420 expuestos en la SEQ ID NO: 3, e inhibe la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B humana después de 16 a 24 h en al menos 30%, en células HepG2 al 80% de confluencia en un cultivo en una concentración 150 nM. En algunos aspectos, el compuesto antisentido de 8 a 50 bases nucleicas de longitud hibrida con los nucleótidos 3230-3288 expuestos en la SEQ ID NO: 3 e inhibe la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B humana después de 16 a 24 h en al menos 30%, en células HepG2 al 80% de confluencia en un cultivo en una concentración 150 nM. En otro aspecto, los compuestos inhiben la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B en al menos 50%, después de 16 a 24 en células HepG2 al 80% de confluencia en una concentración 150 nM.

- 25 En un aspecto, los compuestos de la descripción están dirigidos a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en el que dicho compuesto hibrida específicamente con e inhibe la expresión de la forma larga de la apolipoproteína B, la ApoB-100. En otro aspecto, los compuestos hibridan específicamente con dicho ácido nucleico e inhiben la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B en al menos 5%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivo a una concentración óptima. En otro aspecto más, los compuestos inhiben la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B en al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, o al menos 50%.

- 30 En otro aspecto, los compuestos son oligonucleótidos antisentido, y en un aspecto, el compuesto tiene una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 224, el oligonucleótido antisentido hibrida con una región complementaria al SEQ ID NO: 224, el compuesto comprende la SEQ ID NO: 224, el compuesto consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 224 o el compuesto consiste en la SEQ ID NO: 224.

- 35 En otro aspecto, el compuesto tiene una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 247, el oligonucleótido antisentido hibrida con una región complementaria al SEQ ID NO: 247, el compuesto comprende la SEQ ID NO: 247, el compuesto consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 247 o el compuesto consiste en la SEQ ID NO: 247.

- 40 En otro aspecto, el compuesto tiene una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 319, el oligonucleótido antisentido hibrida con una región complementaria al SEQ ID NO: 319, el compuesto comprende la SEQ ID NO: 319, el compuesto consiste esencialmente en la SEQ ID NO: 319 o el compuesto consiste en la SEQ ID NO: 319.

En un aspecto, los compuestos comprenden al menos un enlace internucleósido modificado, y en otro aspecto, el enlace internucleósido es una unión fosforotioato.

- 45 En otro aspecto, los compuestos comprenden al menos un resto de azúcar modificado, y en un aspecto, el resto de azúcar modificado es un resto de 2'-O-metoxietil-azúcar.

En otro aspecto, los compuestos comprenden al menos una base nucleica modificada, y en un aspecto la base nucleica modificada es una 5-metilcitosina.

En otro aspecto más, los compuestos son oligonucleótidos quiméricos. Los compuestos quiméricos preferidos incluyen los que tienen uno o más enlaces fosforotioato y que además comprenden alas de 2'-metoxietoxil-nucleótido y un hueco de 10 bases nucleicas 2'-desoxinucleótidos.

5 En otro aspecto, los compuestos hibridan específicamente con e inhiben la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica una forma empalmada alternativamente de la apolipoproteína B.

También se describen en la presente memoria composiciones que comprenden un compuesto de la descripción y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende además un sistema de dispersión coloidal, y en otro aspecto, el compuesto en la composición es un oligonucleótido antisentido. En algunos aspectos, la composición comprende un compuesto antisentido de la descripción hibridado con una hebra complementaria. La hibridación de la cadena antisentido puede formar uno o más extremos romos o uno o más extremos salientes. En algunos aspectos, el extremo saliente comprende una base modificada.

15 También se describen en la presente memoria métodos para inhibir la expresión de la apolipoproteína B en células o tejidos, que comprenden poner en contacto dichas células o tejidos con un compuesto de la descripción de modo que se inhiba la expresión de la apolipoproteína B. También se describen métodos para tratar un animal que tiene una enfermedad o afección asociada con la apolipoproteína B, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la descripción, de modo que se inhiba la expresión de la apolipoproteína B. En diferentes aspectos, la afección está asociada con el metabolismo anómalo de lípidos, la afección está asociada con el metabolismo anómalo de colesterol, la afección es la aterosclerosis, la afección es una afección metabólica común, la afección metabólica anómala es la hiperlipidemia, la enfermedad es la diabetes, la diabetes es diabetes de tipo 2, la afección es la obesidad y/o la enfermedad es una enfermedad cardiovascular.

20 También se describen en la presente memoria métodos para modular los niveles de glucosa en un animal que comprenden administrar a dicho animal un compuesto de la descripción, y en un aspecto, el animal es un ser humano. En diferentes aspectos, los niveles de glucosa son niveles de glucosa plasmática, los niveles de glucosa son niveles de glucosa en el suero, y/o el animal es un animal diabético.

También se describen en la presente memoria métodos para prevenir o retrasar el inicio de una enfermedad o afección asociada con la apolipoproteína B en un animal, que comprenden administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la descripción. En un aspecto, el animal es un ser humano. En otros aspectos, la afección es una afección metabólica anómala, la afección metabólica anómala es la hiperlipidemia, la enfermedad es la diabetes, la diabetes es la diabetes de tipo 2, la afección es la obesidad, la afección es la aterosclerosis, la afección implica el metabolismo anómalo de lípidos, y/o la afección implica el metabolismo anómalo de colesterol.

30 También se describen en la presente memoria métodos para prevenir o retrasar el inicio de un aumento de los niveles de glucosa en un animal, que comprenden administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la descripción. En un aspecto, el animal es un ser humano. En otros aspectos, los niveles de glucosa son niveles de glucosa en el suero y/o los niveles de glucosa son niveles de glucosa plasmática.

También se describen en la presente memoria métodos para modular los niveles de colesterol en el suero en un animal, que comprenden administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la descripción. En un aspecto, el animal es un ser humano.

También se describen en la presente memoria métodos para modular los niveles de lipoproteínas en un animal, que comprenden administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la descripción. En un aspecto, el animal es un ser humano. En otros aspectos, la lipoproteína es VLDL, la lipoproteína es HDL, y/o la lipoproteína es LDL.

45 También se describen en la presente memoria métodos para modular los niveles de triglicéridos en el suero en un animal, que comprenden administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto de la descripción. En un aspecto, el animal es un ser humano.

También se describe en la presente memoria el uso de un compuesto de la descripción para fabricar un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B, un medicamento para el tratamiento de una afección asociada con el metabolismo anómalo de lípidos, un medicamento para el tratamiento de una afección asociada con el metabolismo anómalo del colesterol, un medicamento para el tratamiento de la aterosclerosis, un medicamento para el tratamiento de la hiperlipidemia, un medicamento para el tratamiento de la diabetes, un medicamento para el tratamiento de la diabetes de tipo 2, un medicamento para el tratamiento de la obesidad, un medicamento para el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, un medicamento para prevenir o retrasar el inicio de niveles aumentados de glucosa, un medicamento para prevenir o retrasar el inicio de niveles aumentados de glucosa en el suero, un medicamento para prevenir o retrasar el inicio de niveles aumentados de glucosa plasmática, un medicamento para modular los niveles de colesterol en el suero, un medicamento para modular los niveles de lipoproteínas en el suero, un medicamento

para modular los niveles de VLDL en el suero, un medicamento para modular los niveles de HDL en el suero y/o un medicamento para modular los niveles de LDL en el suero, un medicamento para modular los niveles de triglicéridos en el suero.

En otro aspecto, se describen en la presente memoria métodos para reducir los niveles de lipoproteínas circulantes, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B. En otro aspecto, se describen en la presente memoria métodos para reducir el transporte de lipoproteínas, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B. También se describen en la presente memoria métodos para reducir la absorción/adsorción de lipoproteínas, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B.

En otro aspecto, se describen en la presente memoria métodos para reducir los niveles de triglicéridos circulantes, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de la apolipoproteína B. También se describen métodos para reducir el transporte de triglicéridos, que comprende la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de la apolipoproteína B. También se describen en la presente memoria métodos para reducir la absorción/adsorción de triglicéridos, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de la apolipoproteína B.

En otro aspecto, se describen en la presente memoria métodos para reducir los niveles de colesterol circulantes, incluyendo ésteres de colesterilo y/o colesterol no esterificado, que comprenden la etapas de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B. También se contemplan métodos para reducir el transporte de colesterol, incluyendo ésteres de colesterilo y/o colesterol no esterificado, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B. También se describen en la presente memoria métodos para reducir la absorción/adsorción de colesterol, incluyendo ésteres de colesterilo y/o colesterol no esterificado, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de la apolipoproteína B.

También se describen en la presente memoria métodos para reducir los niveles de lípidos circulantes, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B. También se describen en la presente memoria, métodos para reducir el transporte de lípidos en el plasma, que comprende la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de la apolipoproteína B. Además se describen en la presente memoria métodos para reducir la absorción/adsorción de lípidos, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B.

También se describen en la presente memoria métodos para reducir los niveles de lípidos de la dieta, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B. También se describen métodos para reducir el transporte de lípidos de la dieta, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B, así como métodos para reducir la absorción/adsorción de lípidos de la dieta que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B.

También se describen en la presente memoria métodos para reducir los niveles de ácidos grasos circulantes, que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B. También se describen en la presente memoria métodos para reducir el transporte de ácidos grasos, que comprende la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de la apolipoproteína B. También se contemplan métodos para reducir la absorción de ácidos grasos, que comprende la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de la apolipoproteína B.

También se describen en la presente memoria métodos para reducir los reactantes de fase aguda circulantes, que comprenden las etapas de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B. En otro aspecto, se describen en la presente memoria métodos para reducir el transporte de reactantes de fase aguda, que comprenden las etapas de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B, así como métodos para reducir la absorción de reactantes de fase aguda que comprenden las etapas de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B.

También se describen en la presente memoria métodos para reducir los quilomicrones circulantes que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B, métodos para reducir el transporte de quilomicrones que comprenden la etapa de

administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B, y métodos para reducir la absorción de quilomicrones que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B.

- 5 También se describen en la presente memoria métodos para reducir las partículas remanentes de quilomicrones circulantes que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B, métodos para reducir el transporte de remanentes de quilomicrones que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B, y métodos para reducir la absorción de remanentes de quilomicrones que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B.

- 10 También se describen en la presente memoria métodos para reducir el VLDL, IDL, LDL, y/o HDL circulantes que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B. Igualmente, se describen en la presente memoria métodos para reducir el transporte de VLDL, LDL, IDL y/o HDL que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B, además de métodos para reducir la absorción de VLDL, IDL, LDL y/o HDL que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B.

- 15 En otro aspecto más, se describen en la presente memoria métodos para tratar una afección asociada con la expresión de apolipoproteína B que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de apolipoproteína B, seleccionada dicha afección de hiperlipoproteinemia, hiperlipoproteinemia familiar de tipo 3 (disbetalipoproteinemia familiar), e hiperalfalipoproteinemia familiar; hiperlipidemia, hiperlipidemias mixtas, hiperlipidemia tipo lipoproteína múltiple, e hiperlipidemia combinada familiar; hipertrigliceridemia, hipertrigliceridemia familiar, y lipoproteína lipasa familiar; hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia poligénica, y apolipoproteína B defectuosa familiar; trastornos cardiovasculares incluyendo aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria; enfermedad vascular periférica; enfermedad de von Gierke (enfermedad de almacenamiento del glucógeno, tipo I); lipodistrofias (formas congénita y adquirida); síndrome de Cushing; enanismo ateliótico sexual (deficiencia de la hormona del crecimiento aislada); diabetes mellitus; hipertiroidismo; hipertensión; anorexia nerviosa; síndrome de Werner; porfiria intermitente aguda; cirrosis biliar primaria; obstrucción biliar extrahepática; hepatitis aguda; hepatoma; lupus eritematoso sistémico; gammopatías monoclonales (incluyendo mieloma, mieloma múltiple, macroglobulinemia y linfoma); endocrinopatías; obesidad; síndrome nefrótico; síndrome metabólico; inflamación; hipotiroidismo; uremia (hiperuricemia); impotencia; enfermedad hepática obstructiva; hipercalcemia idiopática; disglobulinemia; niveles de insulina elevados; síndrome X; contractura de Dupuytren; y enfermedad de Alzheimer y demencia.

- 20 También se describen en la presente memoria métodos para reducir el riesgo de una afección que comprenden las etapas de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para inhibir la expresión de apolipoproteína B, seleccionada dicha afección de embarazo; claudicación intermitente; gota; y enfermedad por toxicidad de mercurio y amalgamas.

- 25 También se describen en la presente memoria métodos para inhibir la unión de partículas de colesterol al endotelio vascular que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para inhibir la expresión de apolipoproteína B, y como resultado también se describen en la presente memoria métodos para reducir el riesgo de: (i) oxidación de partículas de colesterol; (ii) unión de monocitos al endotelio vascular; (iii) diferenciación de monocitos en macrófagos; (iv) ingestión por macrófagos de partículas de lípidos oxidadas y liberación de citoquinas (incluyendo, pero sin limitar, IL-1, TNF-alfa, TGF-beta); (v) formación de plaquetas de lesiones de fibrograsa fibrosa e inflamación; (vi) lesiones del endotelio que conducen a coágulos; y (vii) coágulos que conducen a infarto de miocardio o accidente cerebrovascular, que también comprenden las etapas de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para inhibir la expresión de apolipoproteína B.

- 30 También se describen en la presente memoria métodos para reducir la hiperlipidemia asociada con alcoholismo, tabaco, uso de anticonceptivos orales, uso de glucocorticoides, uso de agentes de bloqueo beta-adrenérgicos, o uso de isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico) que comprenden la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la descripción suficiente para inhibir la expresión de apolipoproteína B

- 35 También se describe en la presente memoria un compuesto oligonucleótidos antisentido de 8 a 50 bases nucleicas de longitud que comprende al menos 8 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 247 y que tiene una longitud de al menos 12 o al menos de 14 a 30 bases nucleicas.

La invención proporciona un compuesto oligonucleótido antisentido de 20 bases nucleicas de longitud que tiene una secuencia de bases nucleicas como se expone en la SEQ ID NO: 247 y que comprende 5-metilcitidina en las bases nucleicas 2, 3, 5, 9, 12, 15, 17, 19 y 20, en el que cada enlace internucleósido es un enlace fosforotioato, las bases

nucleicas 1-5 y 16-20 comprenden una modificación 2'-metoxietoxilo, y las bases nucleicas 6-15 son desoxinucleótidos.

También se describe en la presente memoria un compuesto que comprende una primera cadena de bases nucleicas, de 8 a 50 bases nucleicas de longitud y que comprende una secuencia de al menos 8 bases nucleicas contiguas de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3, hibridada con una segunda cadena de bases nucleicas, de 8 a 50 bases nucleicas de longitud, y que comprende una secuencia suficientemente complementaria de la primera para permitir así la hibridación estable, inhibiendo dicho compuesto la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B después de 16 a 24 h, en al menos 30% o al menos 50%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivos en una concentración 100 nM.

Se describe además una vesícula, tal como un liposoma, que comprende un compuesto o composición de la descripción.

Los métodos preferidos de administración de los compuestos o composiciones de la descripción, a un animal son por vía intravenosa, subcutánea u oral. La administración se puede repetir.

También se describe en la presente memoria un método para reducir la secreción de lipoproteína (a) por lo hepatocitos, que comprende (a) poner en contacto los hepatocitos con una cantidad de una composición que comprende un compuesto no catalítico de 8 a 50 bases nucleicas de longitud que hibrida específicamente con el ARNm que codifica la apolipoproteína B humana e inhibe la expresión del ARNm después de 16 a 24 h, en al menos 30% o al menos 50%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivos en una concentración 150 nM, en el que al menos dicha cantidad es eficaz para inhibir la expresión de la apolipoproteína B en los hepatocitos; y (b) medir la secreción de la lipoproteína (a) por los hepatocitos.

También se describe en la presente memoria un método para tratar una afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B en un primate, tal como un ser humano, que comprende administrar al primate una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto no catalítico de 8 a 50 bases nucleicas de longitud que hibrida específicamente con el ARNm que codifica la apolipoproteína B humana e inhibe la expresión del ARNm después de 16 a 24 h, en al menos 30% o al menos 50%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivos en una concentración 150 nM.

También se describe en la presente memoria un método para reducir la expresión de la apolipoproteína B en el hígado de un animal, que comprende administrar al animal entre 2 mg/kg y 20 mg/kg de un compuesto no catalítico de 8 a 50 bases nucleicas de longitud que hibrida específicamente con el ARNm que codifica la apolipoproteína B humana en al menos 30% o al menos 50%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivos en una concentración 150 nM.

También se describe un método para fabricar un compuesto de la descripción que comprende hibridar específicamente in vitro una primera cadena de bases nucleicas que comprende una secuencia de al menos 8 bases nucleicas contiguas de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:3 con una segunda cadena de bases nucleicas que comprende una secuencia suficientemente complementaria de dicha primera cadena de forma que permite la hibridación estable.

También se describe en la presente memoria el uso de un compuesto de la descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de todas y cada una de las afecciones descritas en la presente memoria.

Descripción Detallada De La Invención

La presente invención usa compuestos oligómeros, específicamente oligonucleótidos antisentido, para usar en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican la apolipoproteína B, modulando finalmente la cantidad de apolipoproteína B producida. Esto se logra proporcionando compuestos antisentido que hibridan específicamente con uno o más ácidos nucleicos que codifican la apolipoproteína B. Como se usa en la presente memoria, las expresiones "ácido nucleico diana" y "ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B" abarcan ADN que codifica la apolipoproteína B, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm) transcritos a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con un ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos con los que hibrida específicamente se denomina "antisentido". Las funciones del ADN con las que se va a interferir incluyen la replicación y transcripción. Las funciones del ARN con las que se va a interferir incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, traducción de proteínas a partir de ARN, empalme del ARN para dar una o más especies de ARNm y actividad catalítica en la que puede estar implicado o ser facilitada por el ARN. El efecto global de dicha interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de la apolipoproteína B. En el contexto de la presente invención, "modulación" significa un aumento (estimulación) o una disminución (inhibición) de la expresión de un gen. En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación de la expresión génica y el ARNm es una diana preferida.

Se prefiere dirigirse a ácidos nucleicos específicos para el procedimiento antisentido. "Dirigir" un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular, en el contexto de esta invención, es un procedimiento de múltiples etapas. El procedimiento normalmente empieza con la identificación de una secuencia de ácido nucleico cuya función se va a modular. Este puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada con un trastorno o estado patológico particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente invención, la diana es una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B. El proceso de dirigir también incluye determinar un sitio o sitios en este gen para que se produzca la interacción antisentido de modo que resulte el efecto deseado, p. ej., la detección o modulación de la expresión de la proteína. En el contexto de la presente descripción, un sitio intragénico preferido es la región que abarca el codón de inicio o terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del gen. Puesto que como se conoce en la técnica el codón de inicio de la traducción típicamente es 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la correspondiente molécula de ADN), el codón de inicio de la traducción también se denomina "codón AUG", el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tienen un codón de inicio de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y se ha mostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan in vivo. Por lo tanto, las expresiones "codón de inicio de la traducción" y "codón de inicio" pueden abarcar muchas secuencias de codones, incluso aunque el aminoácido iniciador en cada caso típicamente es metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). También se sabe en la técnica que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales se puede usar preferiblemente para el inicio de la traducción en un tipo de célula o tejido particular, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la invención, "codón de inicio" y "codón de inicio de la traducción" se refiere al codón o codones que se usan in vivo para iniciar la traducción de una molécula de ARNm transcrita a partir de un gen que codifica la apolipoproteína B, independientemente de la o las secuencias de dichos codones.

También se conoce en la técnica, que un codón de terminación de la traducción (o "codón de parada") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las correspondientes secuencias de ADN son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente). Las expresiones "región del codón de inicio" y "región del codón de inicio de la traducción", se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que abarca desde aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio de la traducción. De forma similar, las expresiones "región del codón de parada" y "región del codón de terminación de la traducción", se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que abarca desde aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que se sabe en la técnica que se refiere a la región entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región que puede ser una región diana de forma eficaz. Otras regiones diana incluyen la región 5' no traducida (5'UTR), que se sabe en la técnica que se refiere a la parte de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de inicio de la traducción, y por lo tanto incluye los nucleótidos entre el sitio de la caperuza 5' y el codón de inicio de la traducción de un ARNm o los correspondientes nucleótidos en el gen, y la región 3' no traducida (3'UTR) que se sabe en la técnica que se refiere a la parte de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y por lo tanto incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o los correspondientes nucleótidos en el gen. La caperuza 5' de un ARNm comprende un resto de guanosina N7-metilado unido al resto más extremo 5' del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. La región de la caperuza 5' de un ARNm se considera que incluye la propia estructura de la caperuza 5' así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la caperuza. La región de la caperuza 5' también puede ser una región diana preferida.

Aunque algunos ARNm eucariotas son traducidos directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones" que son escindidas de un transcrito antes de ser traducidas. El resto de las regiones (y por lo tanto traducidas) se conocen como "exones" y son empalmadas entre sí para formar una secuencia de ARNm continua. Los sitios de empalme del ARNm, es decir, las uniones intrón-exón, también pueden ser regiones diana preferidas, y son particularmente útiles en situaciones en las que en la enfermedad está implicado el empalme aberrante, o cuando está implicado en la enfermedad un exceso de producción de un producto de empalme de ARNm particular. Las uniones de fusiones aberrantes debidas a reordenamientos o eliminaciones también son dianas preferidas. También se ha encontrado que los intrones también pueden ser regiones diana eficaces, y por lo tanto preferidas, para los compuestos antisentido dirigidos, por ejemplo, a ADN o pre-ARNm.

Se han identificado uno o más sitios diana, y se eligen oligonucleótidos que son suficientemente complementarios de la diana, es decir, hibridan suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado.

En el contexto de esta invención, "hibridación" significa enlace de hidrógeno, que puede ser enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inversos. Por ejemplo, la adenina y la timina son bases nucleicas complementarias que se aparean mediante la formación de enlaces de hidrógeno. "Complementario," como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad para el apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una determinada posición de un oligonucleótido es capaz de formar enlace de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces se considera que el nucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos

que pueden formar enlaces de hidrógeno unos con otros. Por lo tanto, "que puede hibridar específicamente" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso de modo que se produce una unión específica y estable entre los oligonucleótidos y al ADN o ARN diana. Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto antisentido no es necesario que sea 100% complementaria de la de su ácido nucleico diana para que puede hibridar específicamente. Un compuesto antisentido puede hibridar específicamente cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias que no son diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos in vitro, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

Los compuestos antisentido y otros compuestos de la invención que hibridan con la diana e inhiben la expresión de la diana, se identifican mediante experimentación, y las secuencias de estos compuestos se identifican en lo sucesivo como realizaciones preferidas de la invención. Los sitios diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en lo sucesivo "sitios activos" y por lo tanto son sitios preferidos para usar como dianas. Por lo tanto, otra realización de la invención abarca compuestos que hibridan con estos sitios activos.

Los compuestos antisentido normalmente se usan como reactivos de investigación y diagnóstico. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, los usan a menudo los expertos en la técnica para elucidar la función de genes particulares. Los compuestos antisentido también se usan, por ejemplo, para distinguir entre funciones de diferentes miembros de una ruta biológica. Por lo tanto, la modulación antisentido se ha aprovechado para uso en investigación.

Para usar en kits y en diagnóstico, los compuestos antisentido de la presente invención, solos o en combinación con otros compuestos antisentido o compuestos terapéuticos, se pueden usar como herramientas en análisis diferencial y/o combinatorio para elucidar patrones de expresión de una parte o del complemento entero de genes expresados en células y tejidos.

Se comparan los patrones de expresión en células o tejidos tratados con uno o más compuestos antisentido con células o tejidos de control no tratados con compuestos antisentido y se analizan los diferentes niveles de expresión génica en los patrones producidos en lo que se refiere, por ejemplo, a la asociación con la enfermedad, ruta de señalización, localización celular, nivel de expresión, tamaño, estructura o función de los genes examinados. Los análisis se pueden llevar a cabo en células estimuladas o no estimuladas y en presencia o ausencia de otros compuestos que afectan a los patrones de expresión.

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

La especificidad y sensibilidad del compuesto antisentido también la aprovechan los expertos en la técnica para usos terapéuticos. Se han usado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de estados patológicos en animales y el hombre. Los fármacos de oligonucleótidos antisentido, incluyendo ribozimas, se han administrado de forma segura y eficaz a seres humanos y actualmente están en marcha numerosos ensayos clínicos. Por lo tanto, está establecido que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que se pueden configurar para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, en especial seres humanos.

En el contexto de esta invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o un polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Por tanto, este término incluye oligonucleótidos compuestos por bases nucleicas presentes en la naturaleza, azúcares y enlaces internucleósidos covalentes (cadena principal) (ARN y ADN), así como oligonucleótidos que tienen porciones que no son de origen natural que actúan de manera similar (miméticos de oligonucleótidos). Con frecuencia se prefieren los miméticos de oligonucleótidos frente a las formas naturales debido a las propiedades deseables tales como, por ejemplo, mayor captación celular, mayor afinidad por el ácido nucleico diana y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

Aunque los oligonucleótidos antisentido son una forma preferida de compuesto antisentido, la presente descripción incluye otros compuestos antisentido oligómeros, incluyendo, pero sin limitar miméticos de oligonucleótidos tal como se describe a continuación. Los compuestos antisentido de acuerdo con esta descripción comprenden de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 bases nucleicas (es decir, de aproximadamente 8 a aproximadamente 50 nucleósidos unidos). Los compuestos antisentido particularmente preferidos son oligonucleótidos antisentido, incluso más preferiblemente los que comprenden de aproximadamente 12, aproximadamente 14, aproximadamente 20 a aproximadamente 30 bases nucleicas. Los compuestos antisentido incluyen ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS) (oligozimas) y otros ARN catalíticos cortos u oligonucleótidos catalíticos que hibridan con el ácido nucleico diana y modulan su expresión. En realizaciones preferidas, el compuesto antisentido es un oligonucleótido no catalítico, es decir, no depende de una propiedad catalítica del oligonucleótido para su actividad moduladora. Los compuestos antisentido de la invención pueden incluir moléculas bicatenarias en las que una primera cadena es hibridada establemente con una segunda cadena.

Tal y como se conoce en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La porción de base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido al resto 2', 3' o 5' hidroxilo del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato enlazan covalentemente nucleósidos entre sí, para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de esta estructura polimérica lineal se pueden unir además para formar una estructura circular, sin embargo, en general se prefieren las estructuras lineales abiertas. Dentro de la estructura del oligonucleótido, los grupos fosfato se conocen comúnmente como los que forman la cadena principal de internucleósidos del oligonucleótido. El enlace normal o cadena principal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

Los ejemplos específicos de compuestos antisentido útiles en esta invención incluyen oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces internucleósidos no naturales. Tal y como se define en esta memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen los que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal y los que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. A los efectos de esta memoria descriptiva, y a veces como referencia en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica, también se pueden considerar oligonucleósidos.

Las cadenas principales de oligonucleótidos modificadas preferidas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquil-fosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo incluyendo fosfonatos de 3'-alquileo, fosfonatos de 5'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino-fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos de estos unidos 2'-5', y aquellos que tienen polaridad inversa en la que uno o más enlaces internucleótidos es un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad inversa comprenden un enlace sencillo de 3' a 3' en el enlace internucleótido más extremo 3', es decir un solo resto de nucleósido inverso que puede ser sin base (la base nucleica no está o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También están incluidas diferentes sales, sales mixtas o formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, peso sin limitar, las patentes de EE.UU.: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050.

Las cadenas principales de oligonucleótidos modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen cadenas principales que están formadas por uniones internucleósidos de alquilo de cadena corta o cicloalquilo, uniones internucleósidos de heteroátomo mixto o cicloalquilo, o una o más uniones internucleósidos heteroatómico de cadena corta o heterocíclico. Estos incluyen los que tienen uniones morfolino (formadas en parte de la parte de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metilenformacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de riboacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenimino y metilenhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen partes con componentes N, O, S y CH₂ mezclados.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, peso sin limitar, las patentes de EE.UU.: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleósido, es decir, la cadena principal, de las unidades de nucleótidos se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades de bases se

mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Uno de dichos compuestos oligómeros, un mimético de oligonucleótido que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, la cadena principal-azúcar de un oligonucleótido se sustituyen con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las bases nucleicas se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte de amida de la cadena principal. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos PNA incluyen, pero sin limitar, las patentes de EE.UU.: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Se pueden encontrar enseñanzas adicionales de compuestos PNA en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Las realizaciones más preferidas de la invención son oligonucleótidos con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales con heteroátomos, y en particular $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-O-CH}_2-$ [conocido como cadena principal de metilen(metilimino) o MMI], $-\text{CH}_2\text{-O-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2-$ y $-\text{O-N}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-CH}_2-$ [en los que la cadena principal de fosfodiéster natural está representada como $-\text{O-P-O-CH}_2-$] en la patente de EE.UU. citadas antes 5.489.677, y las cadenas principales de amida de la patente de EE.UU. citada antes 5.602.240. También se prefieren los oligonucleótidos que tienen estructuras de cadena principal de morfolino de la patente de EE.UU. citadas antes 5.034.506.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo de C_1 a C_{10} o alqueno y alquino de C_2 a C_{10} sustituidos o no sustituidos. Se prefieren en particular $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, en los que n y m son de aproximadamente 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C_1 a C_{10} , alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH_3 , OCN, Cl, Br, CN, CF_3 , OCF_3 , SOCH_3 , SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalante, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi ($2'\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, también conocida como 2'-O-(2'-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcóxialcoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxietoxi, es decir un grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos a continuación, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, $2'\text{-O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)_2$, también descrito en los ejemplos a continuación.

Una modificación preferida adicional incluye ácidos nucleicos bloqueados (LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando así un resto de azúcar bicíclico. La unión preferiblemente es un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$)_n que forma puente con el átomo de oxígeno en 2' y el átomo de carbono en 4' en el que n es 1 ó 2. Los LNA y su preparación se describe en el documento WO 98/39352 y WO 99/14226.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi ($2'\text{-O-CH}_3$), 2'-aminopropoxi ($2'\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2'-alilo ($2'\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 2'-O-alilo ($2'\text{-O-CH}_2\text{-CH=CH}_2$) y 2'-fluoro ($2'\text{-F}$). La modificación en 2' puede estar en la posición arabino (superior) o la posición ribo (inferior). Una modificación en 2'-arabino preferida es 2'-F. También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, en particular en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en los oligonucleótidos unidos 2'-5' y la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares tales como restos ciclobutilo en lugar el azúcar pentafuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero sin limitar, las patentes de EE.UU.: 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; 5.792.747; y 5.700.920.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases nucleicas (denominadas frecuentemente en la técnica simplemente como "bases"). Tal y como se emplea en la presente memoria, las bases nucleicas "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases púricas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases nucleicas modificadas incluyen otras bases nucleicas naturales o sintéticas tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados 6-metilo y otros alquilo de adenina y guanina, derivados 2-propilo y otros alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halogenouracilo y citosina, derivados 5-propinilo ($-\text{C}\equiv\text{C-CH}_3$) de uracilo y citosina y otros derivados de alquino de bases pirimidínicas, 6-azo-uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8-sustituidas adeninas y guaninas, 5-halógeno en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros 5-sustituido uracilos y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-deazaaguanina y 3-desazaadenina. Las bases nucleicas modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina-citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina-citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), pinzas G tales como una fenoxazina-citidina sustituida (p. ej.

9-(2-aminoetoxy)-H-pirido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona, carbazol-citidina (2H-pirido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol-citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las bases nucleicas modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base púrica o pirimidínica es sustituida por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Ácidos nucleicos adicionales incluyen los descritos en la patente de EE.UU. n° 3.687.808, los descritos en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos descritos por Englisch et al., *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613, y aquellos descritos por Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunos de estas bases nucleicas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligómeros de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del ácido nucleico dúplex en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y actualmente son las sustituciones de bases preferidas, incluso más en particular cuando se combinan con modificaciones 2'-O-metoxietilo en el azúcar.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de las bases nucleicas indicadas antes, así como otras bases nucleicas modificadas incluyen, pero sin limitar, la patente de EE.UU. 3.687.808 indicada antes, así como las patentes de EE.UU.: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617; 5.645.985; 5.830.653; 5.763.588; 6.005.096; y 5.681.941, y patente de Estados Unidos 5.750.692.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica la unión química al oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercalantes, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación de oligómeros, potencian la resistencia de los oligómeros a la degradación, y/o refuerzan la hibridación específica de secuencia con el ARN. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación del oligómero, distribución, metabolismo o excreción. Los grupos conjugados representativos se describen en la solicitud de patente internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre, 1992. Los restos conjugados incluyen, pero sin limitar, restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, p. ej., hexil-S-tritilol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, p. ej., restos dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano-acético (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilaminocarbonil-oxicoolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937).

Los oligonucleótidos de la invención también se pueden conjugar con sustancias que son fármacos activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos 09/334,130 (presentada el 15 de junio, 1999).

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótidos incluyen, peso sin limitar, las patentes de EE.UU.: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado sean modificadas de forma uniforme, y se puede incorporar más de una de las modificaciones mencionadas antes en un solo compuesto o incluso en un solo

nucleósido en un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos antisentido, en particular oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica de modo que confiere al oligonucleótido una resistencia incrementada frente a la degradación con nucleasas, una mayor captación celular y/o un aumento de la afinidad de la unión con el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir ARN:ADN o híbridos de ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de la RNasa H, produce la escisión del ARN diana, potenciando así mucho la eficacia de la inhibición de la expresión génica por el oligonucleótido. Por consiguiente, a menudo se pueden obtener resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, comparado con fosforotioatos de desoxi oligonucleótidos que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana se puede detectar rutinariamente mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas asociadas de hibridación de ácidos nucleicos, conocidas en la técnica.

Los compuestos antisentido quiméricos de la invención se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gámperos. Documentos de patentes representativas de Estados Unidos que describen la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a: 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

Los compuestos antisentido usados de acuerdo con esta invención se pueden preparar convenientemente y de manera rutinaria mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis se puede obtener de varios vendedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Se puede emplear adicional o alternativamente cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados alquilados.

Los compuestos antisentido de la invención se sintetizan in vitro y no incluyen composiciones de compuestos antisentido de origen biológico, o construcciones de vectores genéticos diseñadas para dirigir la síntesis in vivo de moléculas antisentido.

Los compuestos de la invención también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o asociar de otra forma con otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos, tal como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas al receptor, formulaciones por vía oral, rectal, tópica u otras, para ayudar a la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones que ayudan a la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitar, las patentes de EE.UU.: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

Los compuestos antisentido de la invención abarcan cualquier sal, éster o sal de dicho éster o cualquier otro compuesto farmacéuticamente aceptable, que tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o resto del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la descripción señala también profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos, y otros bioequivalentes.

El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva y que se convierte en una forma activa (es decir, fármaco) dentro del cuerpo, o de sus células, por la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones. En particular, las versiones de profármacos de los oligonucleótidos de la invención se preparan como derivados de SATE [(S-acetil-2-tioetil)fosfato] de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 93/24510 de Gosselin et al., publicado el 9 de diciembre 1993 o en los documentos WO 94/26764 y U.S. 5.770.713 de Imbach et al.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto original y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo.

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Los ejemplos de metales usados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Los ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, dicitlohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina, y procaína (véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts," *J. of Pharma Sci.*, 1977, 66, 1-19). Las sales de adición de base de dichos compuestos ácidos se preparan poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal en la forma convencional. La forma de ácido libre se puede regenerar poniendo en contacto la forma de sal con un ácido y aislando el ácido libre de la forma convencional. Las formas de ácido libre difieren algo

de sus respectivas formas de sal en algunas propiedades físicas tales como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a sus respectivos ácidos libres para los propósitos de la presente invención. Como se usa en la presente memoria, una "sal de adición farmacéuticamente" incluye una sal farmacéuticamente aceptable de una forma ácida de uno de los componentes de las composiciones de la invención.

5 Estas incluyen sales de ácidos orgánicos e inorgánicos de las aminas. Las sales de ácido preferidas son hidroclozuros, acetatos, salicilatos, nitratos y fosfatos. Otras sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas para los expertos en la técnica, e incluyen sales básicas de una variedad de ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como, por ejemplo, con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; con ácidos orgánicos carboxílicos, sulfónicos, sulfo o fosfo, o ácidos sulfámicos

10 N-sustituidos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido enbónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico; con aminoácidos, tales como los 20 alfa-aminoácidos implicados en la síntesis de proteínas en la naturaleza, por ejemplo ácido glutámico o ácido aspártico, y también ácido fenilacético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, 2- o 3-fosforoglicerato, glucosa-6-fosfato, ácido N-ciclohexilsulfámico (con la formación de ciclamatos), o con otros compuestos orgánicos ácidos, tales como ácido ascórbico. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos también se pueden

20 preparar con un catión farmacéuticamente aceptable. Los cationes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos para los expertos en la técnica, e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio y amonio cuaternario. También son posibles los carbonatos e hidrogenocarbonatos.

Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen pero no se limitan a (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, calcio, magnesio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido alginico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido poligalacturónico, y similares; y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

25

30

Los compuestos antisentido de la presente invención se pueden usar para el diagnóstico, tratamiento terapéutico, profiláctico y como reactivos y kits de investigación. Para tratamientos terapéuticos, un animal, preferiblemente un ser humano que se sospecha que tiene una enfermedad o trastorno que se puede tratar por modulación de la expresión de la apolipoproteína B, se trata por administración de compuestos antisentido de acuerdo con esta invención. Los compuestos de la invención se pueden usar en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto antisentido a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. El uso de los compuestos antisentido y los métodos de la invención también pueden ser útiles de forma profiláctica, p. ej., para prevenir o retrasar la infección, inflamación o formación de tumor, por ejemplo.

35

Los compuestos antisentido de la invención son útiles para la investigación y el diagnóstico, porque estos compuestos hibridan con ácidos nucleicos que codifican la apolipoproteína B, permitiendo construir fácilmente los ensayos de tipo sándwich y otros ensayos para explotar este hecho. La hibridación de los oligonucleótidos antisentido de esta invención con un ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, se puede detectar por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden incluir la conjugación de una enzima al oligonucleótido, radiomarcado del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. También se pueden preparar kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de apolipoproteína B en una muestra.

40

45

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen compuestos antisentido de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en una serie de formas dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y de la zona que se va a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y en membranas mucosas incluyendo el suministro vaginal y rectal), pulmonar, p. ej., por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo con nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, p. ej., intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para la administración oral.

50

55

Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para la administración tópica pueden incluir parches intradérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o convenientes. También pueden ser útiles los preservativos recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones típicas preferidas incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención están mezclados con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes de quelación y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen los neutros (p. ej. dioleoilfosfatidil-

60

etanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidil-colina DMPC, diestearoilfosfatidil-colina), negativos (p. ej. dimiristoilfosfatidil-glicerol DMPG) y catiónicos (p. ej. dioleoiltrimetilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidil-etanolamina DOTMA). Los oligonucleótidos de la invención se pueden encapsular en liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres preferidos incluyen, pero sin limitar, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, gliceril-1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster de alquilo C₁₋₁₀ (p. ej. miristato de isopropilo IPM), monoglicérido, diglicérido o sus sales farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos 09/315.298 presentada el 20 de mayo, 1999.

Las composiciones y formulaciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o disoluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser convenientes los espesantes, agentes de sabor, diluyentes, emulsionantes, ayudantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se administran junto con uno o más tensioactivos potenciadores de la penetración o quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sus sales, ácidos biliares y/o sus sales. Los ácidos/sales biliares preferidos incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido deshidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio, glicodihidrofusidato de sodio. Los ácidos grasos preferidos incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una de sus sales farmacéuticamente aceptable (p. ej., de sodio). También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácido biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio del ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Otros potenciadores de la penetración incluyen el éter polioxietileno-9-laurilo, éter de polioxietileno-20-cetilo. Los oligonucleótidos de la invención se pueden suministrar por vía oral en forma granular incluyendo partículas secadas por atomización, o complejadas para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos incluyen poli-aminoácidos; poliiminas; poliácridatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivatizadas con DEAE, pululanos, celulosas y almidones. Los agentes de complejación particularmente preferidos incluyen quitosán, N-trimetilquitosán, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometilileno P (TDAE), poliaminoestireno (por ej. p-amino), poli(cianoacrilato de metilo), poli(cianoacrilato de etilo), poli(cianoacrilato de butilo), poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(cianoacrilato de isohexilo), metacrilato de DEAE, hexilacrilato de DEAE, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(D,L-ácido láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato, y polietilenglicol (PEG). Se describen otras formulaciones orales para oligonucleótidos y su preparación en detalle en las solicitudes de Estados Unidos 08/886.829 (presentada el 1 de julio, 1997), 09/108.673 (presentada el 1 de julio, 1998), 09/256.515 (presentada el 23 de febrero, 1999), 09/082.624 (presentada el 21 de mayo, 1998) y 09/315.298 (presentada el 20 de mayo, 1999).

Las composiciones y formulaciones para la administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir disoluciones acuosas estériles, que pueden contener también tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero sin limitar, potenciadores de la penetración, compuestos vehículos y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero sin limitar, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero sin limitar, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los principios activos con el(los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima, los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, moldeando el producto.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquiera de muchas formas farmacéuticas posibles, tales como, pero sin limitar, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden formularse como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se pueden formular y usar en forma de espumas. Las formas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero sin limitar, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Aunque son de naturaleza básicamente similar, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final. La preparación de dichas composiciones y formulaciones en general es conocida para el experto en la técnica farmacéutica y de la formulación, y se puede aplicar a la formulación de las composiciones de la presente invención.

Emulsiones

Las composiciones de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son sistemas típicamente heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotas que normalmente superan 0,1 μm de diámetro (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 2, p. 335; Higuchi et al., en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985, p. 301). Las emulsiones son con frecuencia sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles íntimamente mezcladas y dispersadas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de la forma agua en aceite (ag/ac) o de aceite en agua (ac/ag). Cuando una fase acuosa se divide finamente y se dispersa como gotas minúsculas en una fase oleosa voluminosa, la composición resultante se llama una emulsión de agua en aceite (ag/ac). Alternativamente, cuando una fase oleosa se divide finamente y se dispersa como gotas minúsculas en una fase acuosa voluminosa, la composición resultante se llama una emulsión de aceite en agua (ac/ag). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas y el fármaco activo, que pueden estar presentes como una disolución en la fase acuosa, la fase oleosa o él mismo como una fase separada. También pueden estar presentes excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizantes, colorantes y antioxidantes, en las emulsiones, según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser múltiples emulsiones que están compuestas de más de dos fases tal como, por ejemplo, en el caso de emulsiones de aceite en agua en aceite (ac/ag/ac) y de agua en aceite en agua (ag/ac/ag). Dichas formulaciones complejas a menudo proporcionan ciertas ventajas que las emulsiones binarias sencillas no proporcionan. Las emulsiones múltiples en las que pequeñas gotas de aceite individuales de una emulsión de ac/ag encierran gotas de agua pequeñas constituyen una emulsión de ag/ac/ag. De la misma forma, un sistema de pequeñas gotas de aceite encerradas en glóbulos de agua esterilizada en una fase de aceite continua proporciona una emulsión de ac/ag/ac.

Las emulsiones se caracterizan por tener poca o no tener estabilidad termodinámica. A menudo, la fase dispersa o discontinua de la emulsión está bien dispersa en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma mediante emulsionantes o por la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de bases de pomadas y cremas de tipo emulsión. Otros medios para estabilizar emulsiones implican el uso de emulsionantes que se pueden incorporar en cualquier de las fases de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar ampliamente en 4 categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes naturales, bases de absorción y sólidos finamente dispersos (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los tensioactivos sintéticos, conocidos también como agentes tensioactivos, han encontrado un amplio campo de aplicación en la formulación de emulsiones y se han revisado en la bibliografía (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, volumen 1, p. 199). Los tensioactivos son típicamente anfífilos y comprenden una parte hidrófila y una hidrófoba. La relación de la naturaleza hidrófila a la hidrófoba del tensioactivo se ha denominado el equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa para clasificar y seleccionar tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos se pueden clasificar en diferentes clases basándose en la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfóteros (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 285).

Los emulsionantes naturales usados en formulaciones de emulsiones incluyen lanolina, cera de abeja, fosfátidos, lecitina y goma arábiga. Las bases de absorción tienen propiedades hidrófilas de modo que se pueden empapar en agua para formar emulsiones de ag/ac que todavía retienen la consistencia semisólida, tal como lanolina anhidra y vaselina hidrófila. También se han usado los sólidos finamente divididos como buenos emulsionantes, en especial en combinación con tensioactivos en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas que no se hinchan tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio y magnesio coloidal, pigmentos, y sólidos no polares tales como carbón o triestearato de glicerilo.

También están incluidos una gran variedad de materiales no emulsionantes en formulaciones en emulsión y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 335;

Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los coloides hidrófilos o hidrocoloides incluyen gomas naturales y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, goma arábica, agar, ácido alginico, carragenano, goma guar, goma de karaya y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa) y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o hinchan en agua para formar disoluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando películas interfaciales fuertes alrededor de las pequeñas gotas de la fase dispersa y aumentando la viscosidad de la fase externa.

Puesto que las emulsiones a menudo contienen una serie de ingredientes tales como hidratos de carbono, proteínas, esteroides y fosfátidos, que pueden soportar fácilmente el desarrollo de microbios, estas formulaciones a menudo incorporan conservantes. Los conservantes usados habitualmente incluidos en las formulaciones en emulsión incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, y ácido bórico. También se añaden habitualmente antioxidantes a las formulaciones en emulsión para prevenir el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser depuradores de radicales libres tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado o agentes de reducción tales como ácido ascórbico y metabisulfito sódico, y compuestos sinérgicos de antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

La aplicación de las formulaciones en emulsión por vía dermatológica, oral y parenteral y los métodos para su fabricación han sido revisados en la bibliografía (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199). Las formulaciones en emulsión para el suministro oral se han usado muy ampliamente debido a la facilidad de uso de la formulación, y la eficacia desde el punto de vista de la absorción y la biodisponibilidad. (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199). Los laxantes de base de aceite mineral, las vitaminas solubles en aceite y preparaciones nutritivas de alto contenido en grasa están entre los materiales que se han administrado habitualmente por vía oral en forma de emulsiones de ac/ag.

En una realización de la presente invención, las composiciones de oligonucleótidos y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y compuesto anfílico, que es una sola disolución líquida termodinámicamente estable y ópticamente isótropa (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245). Típicamente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una disolución acuosa de tensioactivo y después añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, en general un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles que están estabilizados mediante películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones normalmente se preparan por una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, cotensioactivo y electrolito. El que la microemulsión sea del tipo de agua en aceite (ag/ac) o de aceite en agua (ac/ag) depende de las propiedades del aceite y el tensioactivo usados y de la estructura y el empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y colas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985, p. 271).

Se ha estudiado ampliamente el procedimiento fenomenológico que usa diagramas de fases y ha dado un conocimiento exhaustivo al experto en la técnica, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 335). Comparadas con las emulsiones normales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de pequeñas gotas termodinámicamente estable que se forman espontáneamente.

Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero sin limitar, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, éteres de polioxietileno y oleilo, ésteres de ácido graso y poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sesquioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DA0750), solos o combinados con cotensioactivos. El cotensioactivo, normalmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial penetrando en la película de tensioactivo y por consiguiente creando una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de tensioactivo. Sin embargo, las microemulsiones se pueden preparar sin usar cotensioactivos y los sistemas de microemulsión autoemulsionantes exentos de alcohol son conocidos en la técnica. La fase acuosa típicamente puede ser, pero sin limitar, agua, una disolución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles, y derivados del

etilenglicol. La fase de aceite puede incluir, pero sin limitar, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y triglicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácido graso y glicerilo polioxiethylado, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados, aceites vegetales y aceite de silicona.

5 Las microemulsiones son particularmente interesantes desde el punto de vista de la solubilización del fármaco y la absorción potenciada de los fármacos. Se han propuesto microemulsiones basadas en lípidos (tanto de ac/ag como de ag/ac) para potenciar la biodisponibilidad oral de fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. *Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas de mejor solubilización del fármaco, protección del fármaco frente a la hidrólisis enzimática, posible potenciación de la absorción de fármaco debido a alteraciones inducidas por el tensioactivo en la fluidez y permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral frente a las formas farmacéuticas sólidas, mejor potencia clínica, y menor toxicidad (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). A menudo las microemulsiones se pueden formar de manera espontánea cuando sus componentes se ponen juntos a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos, péptidos u oligonucleótidos termolábiles. Las microemulsiones también han sido eficaces en el suministro transdérmico de componentes activos tanto en aplicaciones cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones en microemulsión y las formulaciones de la presente invención faciliten la mayor absorción sistémica de oligonucleótidos y ácidos nucleicos del tracto gastrointestinal, así como que mejore la captación celular local de oligonucleótidos y ácidos nucleicos en el tracto gastrointestinal, vagina, cavidad bucal y otras zonas de administración.

Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitán (Grill 3), Labrasol, y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y potenciar la absorción de los oligonucleótidos y ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de la penetración usados en las microemulsiones de la presente invención se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco amplias categorías: tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Cada una de estas clases se ha discutido antes.

Liposomas

Hay muchas estructuras de tensioactivos organizadas además de las microemulsiones que se han estudiado y usado para la formulación de fármacos. Estos incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como los liposomas, han atraído un gran interés debido a su especificidad y a la duración de la acción que ofrecen, desde el punto de vista de suministro del fármaco. Como se usa en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso. La parte acuosa contiene la composición que se va a liberar. Los liposomas catiónicos tienen la ventaja de poder fusionarse con la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no pueden fusionarse de forma tan eficaz con la pared celular, son atrapados por macrófagos in vivo.

Con el fin de cruzar la piel intacta de mamífero, las vesículas lipídicas deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro menor de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por lo tanto, es deseable usar un liposoma que sea muy deformable y pueda pasar a través de dichos poros finos.

Otras ventajas de los liposomas incluyen: los liposomas obtenidos de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar una amplia variedad de fármacos solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger los fármacos encapsulados en sus compartimentos internos frente al metabolismo y la degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 245). En la preparación de formulaciones de liposomas son importantes las consideraciones sobre la carga superficial del lípido, el tamaño de vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

Los liposomas son útiles para la transferencia y suministro de principios activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposomal es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando se aplican liposomas a un tejido, los liposomas empiezan a fusionarse con las membranas celulares. A medida que la fusión del liposoma y la célula avanza, el contenido del liposoma se vacía en la célula donde el agente activo puede actuar.

Las formulaciones liposomales han sido el centro de una investigación exhaustiva como modo de liberación de muchos fármacos. Hay cada vez más pruebas de que para la administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas frente a otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen menos efectos secundarios relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, mayor acumulación del fármaco administrado en la diana deseada, y la capacidad de administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrófilos como hidrófobos, a la piel.

Varias publicaciones han detallado la capacidad de los liposomas para suministrar agentes a la piel, incluyendo ADN de alto peso molecular. Se han administrado a la piel compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADN de alto peso molecular. La mayoría de las aplicaciones se dirigen a la epidermis superior.

Los liposomas están en dos clases amplias. Los liposomas catiónicos son liposomas con carga positiva que interaccionan con moléculas de ADN con carga negativa para formar un complejo estable. El complejo de ADN/liposoma con carga positiva se une a la superficie celular con carga negativa y es internalizado en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen liberando su contenido al citoplasma celular (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles al pH o tienen carga negativa, atrapan ADN más que formar complejo con él. Puesto que tanto el ADN como el lípido están cargados de forma similar, se produce repulsión en lugar de formación de complejo. No obstante, algo de ADN es atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH se han usado para suministrar ADN que codifica el gen de la timidina quinasa a monocapas celulares en cultivo. Se detectó la expresión del gen endógeno en las células diana (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Uno de los tipos principales de composiciones de liposomas incluyen fosfolípidos distintos de la fosfatidilcolina natural. Por ejemplo, se pueden formar composiciones de liposomas neutros a partir de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos en general se forman a partir de dimiristoil-fosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente a partir de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición de liposomas está formada por fosfatidilcolina (PC), tal como por ejemplo, PC de soja y PC de huevo. Otro tipo está formado por mezclas de fosfolípidos y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

Varios estudios han evaluado el suministro tópico de formulaciones liposomales de fármacos a la piel. La aplicación de liposomas que contenían interferón en la piel de cobayas dio como resultado una reducción de las ampollas del herpes cutáneo, mientras que el suministro de interferón por otra vía (p. ej., como una disolución o una emulsión) no era eficaz (Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Además, un estudio adicional ensayó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación liposomal frente a la administración del interferón usando un sistema acuoso, y concluyó que la formulación liposomal era superior a la administración acuosa (du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

Los sistemas liposomales no iónicos también se han examinado para determinar su utilidad en el suministro de fármacos a la piel, en particular sistemas de comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se usaron formulaciones liposomales no iónicas que comprendían Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/éter de estearilo y polioxietileno-10) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/éter de estearilo y polioxietileno-10) para suministrar ciclosporina A en la dermis de la piel de ratón. Los resultados indicaban que tales sistemas liposomales no iónicos eran efectivos en facilitar la deposición de la ciclosporina-A en diferentes capas de la piel (Hu et al. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", un término que como se usa en la presente memoria, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, dan como resultado tiempos de vida en la circulación potenciados con respecto a liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte del lípido que forma la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glucolípidos, tales como monosialogangliósido G_{M1} , o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tal como un resto de polietilenglicol (PEG). Sin querer estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree en la técnica que, al menos para los liposomas estéricamente estabilizados que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivatizados con PEG, la semivida en la circulación potenciada de estos liposomas estéricamente estabilizados deriva de una menor captación en las células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu et al., *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

Se conocen en la técnica diferentes liposomas que comprenden uno o más glucolípidos. Papahadjopoulos et al. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) describieron la capacidad del monosialogangliósido G_{M1} , sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar las semividas en la sangre de los liposomas. Estos hallazgos fueron expuestos por Gabizon et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1988, 85, 6949). La patente de EE.UU. n° 4.837.028 y la publicación internacional WO 88/04924, ambos de Allen et al., describen liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido G_{M1} o un éster sulfato de galactocerebrósido. La patente de EE.UU. n° 5.543.152 (Webb et al.) describe liposomas que comprenden esfingomielina. Los liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se describen en la publicación internacional WO 97/13499 (Lim et al.).

En la técnica se conocen muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrófilos y métodos para su preparación. Sunamoto et al. (*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1980, 53, 2778) describían liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C₁₂15G, que contiene un resto de PEG. Illum et al. (*FEBS Lett.*, 1984, 167, 79) observaron que el recubrimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos daba como resultado semividas en la sangre potenciadas. Describen fosfolípidos sintéticos modificados por unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (p. ej., PEG) Sears (patentes de EE.UU. n° 4.426.330 y 4.534.899). Klibanov et al. (*FEBS Lett.*, 1990, 268, 235) describían experimentos que demostraban que los liposomas que comprendían fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con PEG o estearato de PEG tenían aumentos significativos de las semividas en la circulación sanguínea. Blume et al. (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1029, 91) extendieron

dichas observaciones a otros fosfolípidos derivatizados con PEG, p. ej., DSPE-PEG, formado por la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Se describen liposomas que tienen restos PEG unidos de forma covalente a su superficie externa en la patente europea nº EP 0 445 131 B1 y la publicación internacional WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen 1-20 por ciento en moles de PE derivatizado con PEG, y los métodos para su uso, los describen Woodle et al. (patentes de EE.UU. nº 5.013.556 y 5.356.633) y Martin et al. (patente de EE.UU. nº 5.213.804 y patente europea nº EP 0496813 B1). Se describen liposomas que comprenden una serie de conjugados de lípido-polímero en la publicación internacional WO 91/05545 y la patente de EE.UU. nº 5.225.212 (ambas de Martin et al.) y en la publicación internacional WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Se describen liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG en la publicación internacional WO 96/10391 (Choi et al.). Las patentes de EE.UU. nº 5.540.935 (Miyazaki et al.) y 5.556.948 (Tagawa et al.) describen liposomas que contienen PEG que pueden estar además derivatizados con restos funcionales en sus superficies.

Se conoce un número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos en la técnica. La publicación internacional WO 96/40062 de Thierry et al. describe métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La patente de EE.UU. nº 5.264.221 de Tagawa et al. describe liposomas unidos a proteínas y afirma que el contenido de dichos liposomas puede incluir un ARN antisentido. La patente de EE.UU. nº 5.665.710 de Rahman et al. describe determinados métodos para encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. La publicación internacional WO 97/04787 de Love et al. describe liposomas que comprenden oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen raf.

Los transferosomas son otro tipo más de liposomas, y son agregados de lípidos muy deformables que son candidatos atractivos para vehículos de suministro de fármacos. Los transferosomas se pueden describir como pequeñas gotas lipídicas que son tan deformables que pueden penetrar fácilmente a través de los poros que son más pequeños que las gotas pequeñas. Los transferosomas se pueden adaptar al entorno en el que se usan, p. ej., son autooptimizantes (se adaptan a la forma de los poros en la piel), autorreparadores, con frecuencia alcanzan sus objetivos sin fragmentación, y a menudo autocargables. Para hacer transferosomas se pueden añadir activadores de borde de superficie, normalmente tensioactivos, a una composición de liposomas convencional. Los transferosomas se han usado para suministrar albúmina de suero a la piel. Se ha mostrado que el suministro mediado por transferosoma de la albúmina de suero es tan eficaz como la inyección subcutánea de una disolución que contiene albúmina de suero.

Los tensioactivos tienen una amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. El modo más común de clasificar y ordenar las propiedades de muchos tipos diferentes de tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, es mediante el uso del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrófilo (conocido también como la "cabeza") proporciona el medio más útil para clasificar los diferentes tipos de tensioactivos usados en las formulaciones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, 1988, p. 285).

Si la molécula de tensioactivo no está ionizada, se clasifica como un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos tienen una amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y se pueden usar en un amplio intervalo de valores de pH. En general, sus valores de HLB están en el intervalo de 2 a aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas no iónicas y los éteres tales como alcoholes grasos etoxilados, alcoholes propoxilados y polímeros de bloques etoxilados/propoxilados también están incluidos en esta clase. Los tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo lleva una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, lactilatos de acilo, acilamidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como sulfatos de alquilo y sulfatos de alquilo etoxilados, sulfonatos tales como alquilbencenosulfonatos, acil-isetionatos, acil-tauratos y sulfosuccinatos y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los sulfatos de alquilo y los jabones.

Si la molécula de tensioactivo lleva una carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como catiónico. Los tensioactivos catiónicos incluyen sales de amonio cuaternario y aminas etoxiladas. Las sales de amonio cuaternario son los miembros de esta clase más usados.

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad de llevar una carga positiva o negativa, el tensioactivo se clasifica como anfótero. Los tensioactivos anfóteros incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetainas y fosfátidos.

Se ha revisado el uso de tensioactivos en fármacos, formulaciones y en emulsiones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, 1988, p. 285).

Potenciadores de la penetración

En una realización, la presente invención usa diferentes potenciadores de la penetración para producir el suministro eficaz de ácidos nucleicos, en particular de oligonucleótidos, en la piel de animales. La mayoría de los fármacos

están presentes en disolución tanto en formas ionizada como no ionizada. Sin embargo, normalmente solo los fármacos solubles en lípidos o lipófilos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso fármacos no lipófilos pueden cruzar las membranas celulares si la membrana que se va a cruzar se trata con un potenciador de la penetración. Además de añadir la difusión de fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos.

Los potenciadores de la penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Cada una de las clases mencionadas antes de potenciadores de la penetración se describen a continuación con mayor detalle.

Tensioactivos: En relación con la presente invención, los tensioactivos (o "agentes tensioactivos") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una disolución acuosa, reducen la tensión superficial de la disolución o la tensión interfacial entre la disolución acuosa y otro líquido, con el resultado de que se potencia la absorción de los oligonucleótidos a través de la mucosa. Además de las sales biliares y los ácidos grasos, estos potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, laurilsulfato sódico, éter de laurilo y polioxietileno-9 y éter de cetilo y polioxietileno-20) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92); y emulsiones de productos químicos perfluorados FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Ácidos grasos: Los diferentes ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres de alquilo C₁₋₁₀ de los mismos (p. ej., metilo, isopropilo y t-butilo), y mono y diglicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Sales biliares: La función fisiológica de la bilis incluye el facilitar la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasa (Brunton, capítulo 38 en: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Diferentes sales biliares naturales y sus derivados sintéticos actúan como potenciadores de la penetración. Por lo tanto la expresión "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes naturales de la bilis así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales biliares de la invención incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o sus sal de sodio farmacéuticamente aceptable, colato de sodio), ácido deshidrocólico (deshidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicocolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidrofusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y éter de laurilo y polioxietileno-9 (POE) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, capítulo 39 en: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Agentes quelantes: Los agentes quelantes, como se usa en relación con la presente invención, se pueden definir como compuestos que retiran iones metálicos de la disolución formando complejos con los mismos, con el resultado de que se potencia la absorción de los oligonucleótidos a través de la mucosa. En relación con su uso como potenciadores de la penetración en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de que también sirven como inhibidores de DNasa, ya que la mayoría de las ADN nucleasas caracterizadas requieren un ión metálico divalente para la catálisis y por lo tanto son inhibidas por los agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes de la invención incluyen, pero sin limitar, etilendiaminatetraacetato de sodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (p. ej., salicilato, 5-metoxisalicilato y homovanilato de sodio), derivados de N-acilo del colágeno, derivados de laurith-9 y N-aminoacilo de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

No tensioactivos no quelantes: Como se usa en la presente memoria, los compuestos potenciadores de la penetración no tensioactivos no quelantes se pueden definir como compuestos que demuestran actividad insignificante como agentes quelantes o como tensioactivos pero que, no obstante, potencian la absorción de oligonucleótidos a través de la mucosa digestiva (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluye, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquil- y 1-alquenilazaciclo-alcanona (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco de sodio, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

También se pueden añadir agentes que potencian la captación de oligonucleótidos a nivel celular a las composiciones farmacéuticas y otras composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se sabe que los lípidos

cati6nicos, tales como la lipofectina (Junichi et al, patente de EE.UU. n6 5.705.188), derivados de glicerol cati6nicos y mol6culas policati6nicas tales como la polilisina (Lollo et al., solicitud PCT WO 97/30731), tambi6n potencian la captaci6n celular de oligonucle6tidos.

- 5 Se pueden usar otros agentes para potenciar la penetraci6n de los 6cidos nucleicos administrados, incluyendo glicoles tales como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tales como 2-pirrol, azonas y terpenos tales como limoneno y mentona.

Veh6culos

- 10 Algunas composiciones de la presente invenci6n tambi6n incorporan compuestos veh6culo en la formulaci6n. Como se usa en la presente memoria, "compuesto veh6culo" o "veh6culo" se puede referir a un 6cido nucleico o an6logo del mismo, que es inerte (es decir, no tiene actividad biol6gica por s6 mismo) pero es reconocido como un 6cido nucleico por procesos in vivo que reducen la biodisponibilidad del 6cido nucleico que tiene actividad biol6gica, por ejemplo degradando el 6cido nucleico biol6gicamente activo o promoviendo su eliminaci6n de la circulaci6n.

- 15 La coadministraci6n de un 6cido nucleico y un compuesto veh6culo, t6picamente con un exceso de esta 6ltima sustancia, puede dar como resultado una reducci6n sustancial de la cantidad de 6cido nucleico recuperado en el h6gado, ri6n6n u otros dep6sitos extracirculatorios, supuestamente debido a la competici6n entre el compuesto veh6culo y el 6cido nucleico por un receptor com6n. Por ejemplo, la recuperaci6n de un oligonucle6tido parcialmente fosforotioato en tejido hep6tico se puede reducir cuando se coadministra con 6cido poliinos6nico, sulfato de dextrano, 6cido policit6dico o 6cido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilb6no-2,2'-disulf6nico (Miyao et al., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

Excipientes

- 20 A diferencia de un compuesto veh6culo, un "veh6culo farmac6utico" o "excipiente" es un disolvente farmac6uticamente aceptable, agente de suspensi6n o cualquier otro veh6culo farmacol6gicamente inerte para suministrar uno o m6s 6cidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser l6quido o s6lido y se selecciona, con la forma de administraci6n planeada en mente, de modo que proporcione el volumen, consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un 6cido nucleico y los otros componentes de una composici6n farmac6utica dada. Los veh6culos farmac6uticos t6picos incluyen, pero sin limitar, agentes aglutinantes (p. ej., almid6n de ma6z pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (p. ej., lactosa y otros az6cares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco, s6lice, di6xido de silicio coloidal, 6cido este6rico, estearatos met6licos, aceites vegetales hidrogenados, almid6n de ma6z, polietilenglicoles, benzoato s6dico, acetato s6dico, etc.); disgregantes (p. ej., almid6n, glicolato s6dico de almid6n, etc.); y agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato s6dico, etc.).

- 35 Los excipientes org6nicos o inorg6nicos farmac6uticamente aceptables adecuados para la administraci6n no parenteral que no reaccionan de forma perjudicial con 6cidos nucleicos tambi6n se pueden usar para formular las composiciones de la presente invenci6n. Los veh6culos farmac6uticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitar, agua, disoluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, 6cido sil6cico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

- 40 Las formulaciones para administraci6n t6pica de 6cidos nucleicos puede incluir disoluciones acuosas est6riles y no est6riles, disoluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o disoluciones de los 6cidos nucleicos en bases l6quidas u oleosas s6lidas. Las disoluciones pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden usar excipientes org6nicos o inorg6nicos farmac6uticamente aceptables adecuados para la administraci6n no parenteral que no reaccionen de forma perjudicial con 6cidos nucleicos.

- 45 Los excipientes farmac6uticamente aceptables incluyen, pero sin limitar, agua, disoluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, 6cido sil6cico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Suministro en pulsos

- 50 Los compuestos de la presente invenci6n tambi6n se pueden administrar por suministro en pulsos. "Suministro en pulsos" se refiere a una formulaci6n farmac6utica que suministra un primer pulso de f6rmaco combinado con un potenciador de la penetraci6n y un segundo pulso de potenciador de la penetraci6n para promover la absorci6n del f6rmaco que no se ha absorbido tras la liberaci6n de potenciador de la penetraci6n con el primer pulso.

Una realizaci6n de la presente invenci6n es una formulaci6n oral de liberaci6n retardada para la absorci6n intestinal de f6rmaco potenciada, que comprende:

- 55 (a) una primera poblaci6n de part6culas de veh6culo que comprenden dicho f6rmaco y un potenciador de la penetraci6n, en el que dicho f6rmaco y dicho potenciador de la penetraci6n son liberados en un primer sitio en el intestino; y

(b) una segunda población de partículas de vehículo que comprenden un potenciador de la penetración y un recubrimiento o matriz de liberación retardada, en el que el potenciador de la penetración es liberado en un segundo sitio en el intestino, más abajo del primero sitio, de modo que la absorción del fármaco es potenciada cuando el fármaco alcanza el segundo sitio.

5 Alternativamente, el potenciador de la penetración en (a) y (b) es diferente.

Esta potenciación se obtiene por encapsulación de al menos dos poblaciones de partículas de vehículo. La primera población de partículas de vehículo comprende una sustancia biológicamente activa y un potenciador de la penetración, y la segunda (y opcionalmente adicional) población de partículas de vehículo comprende un potenciador de la penetración y un recubrimiento o matriz para la liberación retardada.

10 Un "efecto del primer paso" que se aplica a los fármacos administrados por vía oral es la degradación debido a la acción del ácido gástrico y diferentes enzimas digestivas. Un medio para mejorar los efectos de eliminación del primer paso es aumentar la dosis del fármaco administrado, compensando de esta forma la proporción de fármaco perdido en la eliminación del primer paso. Aunque esto se puede lograr fácilmente con la administración i.v., por ejemplo, simplemente proporcionando más fármaco a un animal, otros factores influyen en la biodisponibilidad de los fármacos administrados por medios no parenterales. Por ejemplo, un fármaco se puede degradar enzimática o químicamente en el canal alimentario o el torrente sanguíneo y/o puede ser impermeable o permeable frente a diferentes membranas mucosas.

Se contempla también que estas composiciones farmacéuticas son capaces de potenciar la absorción de sustancias biológicamente activas cuando se administran por vía rectal, vaginal, nasal o pulmonar. También se contempla que la liberación de la sustancia biológicamente activa se puede lograr en cualquier parte del tracto gastrointestinal.

20 Las composiciones farmacéuticas líquidas de oligonucleótidos se pueden preparar mediante la combinación del oligonucleótido con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos o disolución salina. Se pueden incluir opcionalmente otros compuestos terapéuticos.

25 La presente invención también contempla el uso de composiciones sólidas en partículas. Dichas composiciones preferiblemente comprenden partículas de oligonucleótido que son de tamaño respirable. Dichas partículas se pueden preparar, por ejemplo, moliendo el oligonucleótido seco por medios convencionales, por ejemplo con un mortero y mano de mortero, y después pasando la composición en polvo resultante a través de un tamiz de malla nº 400 para separar las partículas grandes y los aglomerados. Una composición sólida en partículas compuesta de un oligonucleótido activo puede contener opcionalmente un dispersante que sirve para facilitar la formación de un aerosol, por ejemplo lactosa.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones de oligonucleótidos se pueden aerolizar. La aerolización de partículas líquidas se puede producir por cualquier medio adecuado, tal como un nebulizador. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.501.729. Los nebulizadores son dispositivos disponibles en el comercio que transforman disoluciones o suspensiones en un aerosol de tipo niebla terapéutico por medio de la aceleración de un gas comprimido, típicamente aire y oxígeno, a través de un orificio Venturi estrecho o mediante agitación ultrasónica. 35 Los nebulizadores adecuados incluyen los vendidos por Blairex® con los nombres PARI LC PLUS, PARI DURA-NEB 2000, PARI-BABY Size, compresor PARI PRONEB con LC PLUS, sistema compresor/nebulizador PARI WALKHALER, nebulizador reutilizable PARI LC PLUS y PARI LC Jet+® Nebulizer.

Las formulaciones de ejemplo para usar en los nebulizadores consisten en un oligonucleótido en un líquido, tal como agua estéril exenta de pirógenos, o disolución salina, en la que el oligonucleótido comprende hasta aproximadamente 40% en p/p de la formulación. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende menos de 20% en p/p. Si se desea, se pueden añadir a la composición aditivos adicionales tales como conservantes (por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo), antioxidantes, y agentes de sabor.

45 Las partículas sólidas que comprenden un oligonucleótido también se pueden aerolizar usando cualquier generador de aerosol de medicamento en partículas sólidas conocido en la técnica. Dichos generadores de aerosoles producen partículas respirables, como se ha descrito antes, y además producen dosis medidas reproducibles por unidad de volumen del aerosol. Los generadores de aerosoles de partículas sólidas adecuados incluyen insufladores e inhaladores dosificadores. Los inhaladores dosificadores se usan en la técnica y son útiles en la presente invención.

Preferiblemente, los aerosoles de líquidos o sólidos se producen a una velocidad de aproximadamente 10 a 150 litros por minuto, más preferiblemente de aproximadamente 30 a 150 litros por min y los más preferiblemente aproximadamente 60 litros por min.

La biodisponibilidad potenciada de las sustancias biológicamente activas también se logra mediante la administración oral de las composiciones y los métodos de la presente invención. El término "biodisponibilidad" se refiere a una medición de qué parte de un fármaco administrado llega al sistema circulatorio cuando se usa un modo 55 de administración no parenteral para introducir el fármaco en un animal.

Los potenciadores de la penetración incluyen, pero sin limitar, miembros de clases moleculares tales como tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y moléculas no tensioactivas no quelantes. (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Los vehículos son moléculas inertes que se pueden incluir en las composiciones de la presente invención para que interfieran con los procesos que conducen a la reducción de los niveles del fármaco biodisponible.

Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes auxiliares encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles, farmacéuticamente activos tales como, por ejemplo, agentes antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas farmacéuticas de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes de sabor, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se añaden, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, agentes lubricantes, conservantes, estabilizantes, humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, tampones, colorantes, agentes de sabor y/o sustancias aromáticas y similares, que no interaccionan perjudicialmente con el o los ácidos nucleicos de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

Algunas realizaciones de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos antisentido, y (b) uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo que no es antisentido. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitar, daunorubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-cloroetilnitrosourea, busulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosourea, mostazas nitrogenadas, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxyciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilstilbestrol (DES). Véase, en general, *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 15^a Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J. Cuando se usan con los compuestos de la invención, dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar de forma individual (p. ej., 5-FU y oligonucleótido), secuencial (p. ej., 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros de dichos agentes quimioterapéuticos (p. ej., 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, incluyendo, pero sin limitar, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antiviricos, incluyendo, pero sin limitar, ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también se pueden combinar en composiciones de la invención. Véase, en general, *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, 15th Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N.J., páginas 2499-2506 y 46-49, respectivamente). Otros agentes quimioterapéuticos que no son de tipo antisentido también están dentro del alcance de esta invención. Se pueden usar dos o más compuestos combinados juntos o de forma secuencial.

En otra realización relacionada, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, en particular oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Se conocen numerosos ejemplos de compuestos antisentido en la técnica. Se pueden usar dos o más compuestos combinados juntos o de forma secuencial.

La formulación de las composiciones terapéuticas y su posterior administración se cree que se basa en la experiencia de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y la sensibilidad del estado patológico que se va a tratar, durando el curso del tratamiento desde varios días a varios meses, o hasta que se realice la cura o se logre una disminución del estado patológico. Los esquemas de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y en general se puede calcular basándose en las CE₅₀ encontradas eficaces en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosificación es de 0,01 ug a 100 g por kg de peso corporal, y se puede dar una o más veces al día, de forma semanal, mensual o anual, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la técnica pueden calcular fácilmente la frecuencia de repetición para la dosificación basándose en los tiempos de permanencia medidos y las concentraciones de fármaco en los fluidos corporales o tejidos. Después del tratamiento satisfactorio, puede ser conveniente que el paciente siga una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado patológico, en el que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, en el intervalo de 0,01 ug a 100 g por kg de peso corporal, una o más veces al día, hasta una vez cada 20 años.

Terapia de Combinación

La invención también proporciona métodos de terapia de combinación, en la que se administran uno o más compuestos de la invención y uno o más compuestos terapéuticos/profilácticos para tratar una afección y/o un estado patológico como se describe en el presente documento. En diferentes aspectos, el o los compuestos de la invención y el o los compuestos terapéuticos/profilácticos se coadministran en forma de una mezcla, o se administran de forma individual. En un aspecto, la vía de administración es la misma para el o los compuestos de la invención y el o los compuestos terapéuticos/profilácticos, mientras que en otros compuestos, el o los compuestos de la invención y el o los compuestos terapéuticos/profilácticos se administran por diferentes vías. En una realización, las dosificaciones del o de los compuestos de la invención y el o los compuestos terapéuticos/profilácticos son cantidades que son terapéutica o profilácticamente eficaces para cada compuesto cuando se administran individualmente. Alternativamente, la administración combinada permite el uso de dosificaciones menores que las que se requerirían para lograr un efecto terapéutico o profiláctico si se administraran individualmente, y dichos métodos son útiles para disminuir uno o más efectos secundarios del compuesto de dosis reducida.

En un aspecto, se administran un compuesto de la presente invención y uno o más de los otros compuestos terapéuticos/profilácticos eficaces para tratar una afección, en el que ambos compuestos actúan por el mismo o por diferentes mecanismos. El o los compuestos terapéuticos/profilácticos incluyen, pero sin limitar, resinas secuestrantes de sales biliares (p. ej., colestiramina, colestipol y hidrocloreuro de colessevelam), inhibidores de la HMGCoA-reductasa (p. ej., lovastatina, cerivastatina, prevastatina, atorvastatina, simvastatina, y fluvastatina), ácido nicotínico, derivados del ácido fibrótico (p. ej., clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, bezafibrato, y ciprofibrato), probucol, neomicina, dextrotiroxina, ésteres de estanoles vegetales, inhibidores de la absorción de colesterol (p. ej., ezetimiba), implitapida, inhibidores de transportadores de ácidos biliares (transportadores apicales de ácidos biliares dependientes de sodio), reguladores de CYP7a hepático, productos terapéuticos de sustitución de estrógenos (p. ej., tamoxifen), y antiinflamatorios (p. ej., glucocorticoides).

Por consiguiente, la invención proporciona además el uso de un compuesto de la invención y uno o más de otro u otros compuestos terapéuticos/profilácticos como se describe en la presente memoria, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad o afección como se describe en la presente memoria.

Suministro dirigido

En otro aspecto, se proporcionan métodos para dirigir un compuesto de la invención a un tejido, órgano o sitio específicos del cuerpo. Los ejemplos de dianas incluyen hígado, pulmón, riñón, corazón y placas ateroscleróticas en un vaso sanguíneo. Los métodos para dirigir compuestos son bien conocidos en la técnica.

En una realización el compuesto se dirige por administración directa o local. Por ejemplo, cuando se dirige a un vaso sanguíneo, el compuesto se administra directamente a la parte relevante del vaso desde el interior del lumen, p. ej., balón simple o doble balón, o a través de la túnica adventicia con material que ayuda a la liberación lenta del compuesto, p. ej., un sistema de gel plurónico como describen Simons et al., *Nature* 359: 67-70 (1992). Otras técnicas de liberación lenta para el suministro local del compuesto a un vaso incluyen el recubrimiento de una prótesis endovascular con el compuesto. Se describen métodos de suministro de compuestos antisentido a un vaso sanguíneo en la patente de EE.UU. nº 6.159.946.

Cuando se dirige a un tejido u órgano particular, el compuesto se puede administrar en o alrededor de ese tejido u órgano. Por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.547.787, describe métodos y dispositivos para dirigir agentes terapéuticos al corazón. En un aspecto, la administración se produce por la inyección directa o por inyección a un vaso sanguíneo asociado con el tejido u órgano. Por ejemplo, cuando se dirige al hígado, el compuesto se puede administrar por inyección o infusión a través de la vena porta.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para dirigir un compuesto que incluyen asociar el compuesto con un agente que dirige la captura del compuesto por uno o más tipos de células. Los agentes de ejemplo incluyen lípidos y estructuras basadas en lípidos tales como liposomas, en general en combinación con un resto que se dirige al órgano o tejido específico tal como, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor de superficie celular, un ligando para un receptor de superficie celular, un polisacárido, un fármaco, una hormona, un hapteno, un lípido especial y un ácido nucleico como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.495.532. La patente de EE.UU. nº 5.399.331, describe el acoplamiento de proteínas a liposomas mediante el uso de un agente de reticulación que tiene al menos un grupo maleimido y una función reactiva con amina. Las patentes de EE.UU. nº 4.885.172, 5.059.421 y 5.171.578, describen proteínas que se unen a liposomas mediante el uso de glicoproteína estreptavidina y recubrimiento de liposomas directores con polisacáridos. Otros agentes directores basados en lípidos incluyen, por ejemplo, micelas y productos cristalinos como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.217.886.

En otro aspecto, los agentes directores incluyen microesferas poliméricas porosas que derivan de poliésteres copolímeros y homopolímeros que contienen enlaces éster hidrolizables que son biodegradables, como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.818.542. Los poliésteres típicos incluyen poli(ácido glicólico) (PGA) y poli(ácido láctico)

(PLA), y copolímeros de glicólido y L-lactida) (PGL), que son particularmente adecuados para los métodos y las composiciones de la presente invención, en cuanto que presentan una baja toxicidad humana y son biodegradables. El poliéster u otro polímero, oligómero o copolímero particular usado como matriz polimérica de la microesfera no es crítico y se puede usar una variedad de polímeros dependiendo de la porosidad, consistencia, forma y distribución de tamaños deseados. Otros polímeros o copolímeros biodegradables o bioerosionables incluyen, por ejemplo, gelatina, agar, almidón de maíz, arabinogalactano, albúmina, colágeno, materiales naturales y sintéticos, tales como poli(ϵ -caprolactona), poli(ϵ -caprolactona-CO-ácido láctico), poli(ϵ -caprolactona-CO-ácido glicólico), poli(ácido β -hidroxibutírico), poli(óxido de etileno), polietileno, poli(2-cianoacrilato de alquilo), (p. ej., metilo, etilo, butilo), hidrogeles tales como poli(metacrilato de hidroxietilo), poliamidas (p. ej., poliacrilamida), poli(aminoácidos) (es decir, L-leucina, ácido L-aspartico, L-aspartato de β -metilo, L-aspartato de β -bencilo, ácido glutámico), poli(2-hidroxietil-DL-aspartamida), poli(éster urea), poli(L-fenilalanina/etilenglicol/1,6-diisocianatohehexano) y poli(metacrilato de metilo). Los polímeros naturales y sintéticos de ejemplo adecuados para la liberación dirigida están disponibles en el comercio o se pueden obtener por reacciones de polimerización por condensación a partir de monómeros, comonómeros u oligómeros adecuados.

En otra realización más, la patente de EE.UU. n° 6.562.864 describe catequinas, incluyendo isómeros epi y otros isómeros carbocatiónicos y derivados de los mismos, que como monómeros, dímeros y multímeros mayores, pueden formar complejos con agentes bioactivos catiónicos y nucleófilos para usar como agentes de suministro. Los multímeros de catequinas tienen una fuerte afinidad por proteínas polares, tales como las que residen en el endotelio vascular, y en membranas celulares/orgánulos y son particularmente útiles para el suministro dirigido de agentes bioactivos para seleccionar sitios in vivo. En el tratamiento de enfermedades y trastornos vasculares, tales como la aterosclerosis y enfermedades de las arterias coronarias, el suministro de agentes incluye multímeros de catequinas sustituidas, incluyendo multímeros de catequinas amidadas que se forman por reacción entre catequina y restos que contienen nitrógeno tales como amoniaco.

Otras estrategias para el suministro dirigido de la invención incluyen ADEPT (terapia enzimática con profármaco dirigido por anticuerpo), GDEPT (EPT dirigido por genes) y VDEPT (EPT dirigido por virus) como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.433.012.

La presente invención proporciona además dispositivos médicos y kits para el suministro dirigido, en la que el dispositivo es, por ejemplo, una jeringa, una prótesis endovascular o catéter. Los kits incluyen un dispositivo para administrar un compuesto y un recipiente que comprende un compuesto de la invención. En un aspecto, el compuesto está precargado en el dispositivo. En otras realizaciones, el kit proporciona instrucciones para los métodos de administración del compuesto y dosificaciones. Las patentes de EE.UU. que describen dispositivos y kits médicos para el suministro de compuestos antisentido incluyen las patentes de EE.UU. n° 6.368.356; 6.344.035; 6.344.028; 6.287.285; 6.200.304; 5.824.049; 5.749.915; 5.674.242; 5.670.161; 5.609.629; 5.593.974; y 5.470.307.

Aunque la presente invención ha sido descrita con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar la invención y no están destinados a limitar la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1

Nucleósido-fosforamiditas para la síntesis de oligonucleótidos desoxi y 2'-alcoxi-amiditas

Las 2'-desoxi y 2'-metoxi-beta-cianoetil-diisopropil-fosforamiditas se adquirieron en fuentes comerciales (p. ej. Chemgenes, Needham MA o Glen Research, Inc. Sterling VA). Otras nucleósido-amiditas sustituidas con 2'-O-alcoxi se prepararon como se describe en la patente de EE.UU. 5.506.351. Para los oligonucleótidos sintetizados usando 2'-alcoxi-amiditas, se usó el ciclo estándar para oligonucleótidos no modificados, excepto que la etapa de espera después del suministro de pulso de tetrazol y base se aumentó a 360 s.

Los oligonucleótidos que contenían 5-metil-2'-desoxicidina (5-Me-C) se sintetizaron según los métodos publicados [Sanghvi, et. al., *Nucleic Acids Research*, 1993, 21, 3197-3203] usando fosforamiditas disponibles en el comercio (Glen Research, Sterling VA o ChemGenes, Needham MA).

2'-Fluoro-amiditas

2'-Fluorodesoxiadenosina-amiditas

Los 2'-fluoro-oligonucleótidos se sintetizaron como se ha descrito previamente [Kawasaki, et. al., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 831-841] y patente de Estados Unidos 5.670.633. Brevemente, el nucleósido protegido N6-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoroadenosina se sintetizó usando la 9-beta-D-arabinofuranosiladenina disponible en el comercio como material de partida y modificando los procedimientos de la bibliografía de modo que se introdujera el átomo 2'-alfa-fluoro por un desplazamiento S_N2 de un grupo 2'-beta-trilito. Por lo tanto, la N6-benzoil-9-beta-D-arabinofuranosiladenina se protegió selectivamente con rendimiento moderado como el 3',5'-ditetrahidropirano (THP) intermedio. La desprotección de los grupos THP y N6-benzoil se llevó a cabo usando metodologías

convencionales y métodos convencionales para obtener el 5'-dimetoxitritil-(DMT) y 5'-DMT-3'-fosforamidita intermedios.

2'-Fluorodesoxiguanosina

- 5 La síntesis de la 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina se llevó a cabo usando 9-beta-D-arabinofuranosilguanina protegida con tetraisopropildisiloxanilo (TPDS) como material de partida, y conversión a la diisobutirilarabinofuranosilguanina intermedia. A la desprotección del grupo TPDS le siguió la protección del grupo hidroxilo con THP para dar la arabinofuranosilguanina protegida con diisobutiril-di-THP. A la O-desacetilación selectiva y formación de triflato le siguió el tratamiento del producto bruto con fluoruro, y después desprotección de los grupos THP.

Se usaron metodologías convencionales para obtener las 5'-DMT- y 5'-DMT-3'-fosforamiditas.

10 2'-Fluorouridina

La síntesis de la 2'-desoxi-2'-fluorouridina se llevó a cabo por modificación de un procedimiento de la bibliografía, en el que el 2,2'-anhidro-1-beta-D-arabinofuranosiluracilo se trató con fluoruro de hidrógeno-piridina al 70%. Se usaron procedimientos convencionales para obtener las 5'-DMT- y 5'-DMT-3'-fosforamiditas.

2'-Fluorodesoxicitidina

- 15 La 2'-desoxi-2'-fluorocitidina se sintetizó por aminación de 2'-desoxi-2'-fluorouridina, seguido de protección selectiva para dar N4-benzoil-2'-desoxi-2'-fluorocitidina. Se usaron procedimientos convencionales para obtener las 5'-DMT- y 5'-DMT-3'-fosforamiditas.

Amiditas modificadas con 2'-O-(2-metoxietilo)

- 20 Las nucleósido-amiditas sustituidas con 2'-O-metoxietilo se preparan como sigue, o alternativamente, de acuerdo con los métodos de Martin, P., *Helvetica Chimica Acta*, 1995, 78, 486-504.

2,2'-Anhido[1-(beta-D-arabinofuranosil)-5-metiluridina]

- 25 Se añadieron 5-metiluridina (ribosiltimina, disponible en el comercio en Yamasa, Choshi, Japón) (72,0 g, 0,279 M), carbonato de difenilo (90,0 g, 0,420 M) y bicarbonato sódico (2,0 g, 0,024 M) a DMF (300 ml). La mezcla se calentó a la temperatura de reflujo, con agitación dejando que se liberara de una forma controlada el dióxido de carbono gaseoso formado. Después de 1 h, la disolución ligeramente oscurecida se concentró a presión reducida. El jarabe resultante se vertió en éter dietílico (2,5 litros), con agitación. El producto formó una goma. El éter se decantó y el residuo se disolvió en la mínima cantidad de metanol (aproximadamente 400 ml). La disolución se vertió en éter dietílico de nueva aportación (2,5 litros) para dar una goma rígida. El éter dietílico se decantó y la goma se secó en un horno con vacío (60°C a 1 mm de Hg durante 24 h) para dar un sólido que se trituró hasta un polvo marrón claro (57 g, 85% de rendimiento bruto). El espectro de RMN estaba de acuerdo con la estructura, contaminada con fenol (30 en forma de su sal de sodio (aproximadamente 5%). El material se usó como estaba para las reacciones posteriores (o se purificó más por cromatografía en columna usando un gradiente de metanol en acetato de etilo (10-25%) para dar un sólido blanco, p.f. 222-4°C).

2'-O-Metoxietil-5-metiluridina

- 35 Se añadieron 2,2'-anhidro-5-metiluridina (195 g, 0,81 M), tris(2-metoxietil)borato (231 g, 0,98 M) y 2-metoxietanol (1,2 litros) en un recipiente de presión de acero inoxidable de 2 litros y se puso en un baño de aceite previamente calentado a 160°C. Después de calentar durante 48 h a 155-160°C, el recipiente se abrió y la disolución se evaporó hasta sequedad y se trituró con MeOH (200 ml). El residuo se suspendió en acetona caliente (1 litro). Las sales insolubles se filtraron, se lavaron con acetona (150 ml) y el filtrado se evaporó. El residuo (280 g) se disolvió en CH₃CN (600 ml) y se evaporó. Una columna de gel de sílice (3 kg) se empaquetó en CH₂Cl₂/acetona/MeOH (20:5:3) que contenía Et₃NH al 0,5%. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ (250 ml) y se adsorbió sobre sílice (150 g) antes de cargarlo en la columna. El producto se eluyó con el disolvente de empaquetamiento para dar 160 g (63%) de producto. Se obtuvo material adicional volviendo a tratar las fracciones impuras.

2'-O-Metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metiluridina

- 45 La 2'-O-Metoxietil-5-metiluridina (160 g, 0,506 M) se coevaporó con piridina (250 ml) y el residuo seco se disolvió en piridina (1,3 litros). Se añadió una primera parte alícuota de cloruro de dimetoxitritilo (94,3 g, 0,278 M) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una segunda parte alícuota de cloruro de dimetoxitritilo (94,3 g, 0,278 M) y la reacción se agitó durante una hora adicional. Después se añadió metanol (170 ml) para parar la reacción. La HPLC mostró la presencia de aproximadamente 70% de producto. Se evaporó el disolvente y se trituró con CH₃CN (200 ml). El residuo se disolvió en CHCl₃ (1,5 litros) y se extrajo con 2x500 ml de disolución saturada de NaHCO₃ y 2x500 ml de disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. Se obtuvieron 275 g de residuo. El residuo se purificó en una columna de gel de sílice de 3,5 kg empaquetada y eluida con EtOAc/hexano/acetona (5:5:1) que contenía Et₃NH al 0,5%. Las fracciones puras se

evaporaron para dar 164 g de producto. Se obtuvieron aproximadamente 20 g adicionales de las fracciones impuras para dar un rendimiento total de 183 g (57%).

3'-O-Acetil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metiluridina

- Se combinaron la 2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metiluridina (106 g, 0,167 M), DMF/piridina (750 ml de una mezcla 3:1 preparada a partir de 562 ml de DMF y 188 ml de piridina) y anhídrido acético (24,38 ml, 0,258 M) y se agitaron a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se siguió por TLC inactivando primero la muestra de TLC por adición de MeOH. Tras completarse la reacción, que se juzga por la TLC, se añadió MeOH (50 ml) y la mezcla se evaporó a 35°C. El residuo se disolvió en CHCl_3 (800 ml) y se extrajo con 2x200 ml de disolución saturada de bicarbonato sódico y 2x200 ml de disolución saturada de NaCl. Las capas acuosas se volvieron a extraer con 200 ml de CHCl_3 . Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato sódico y se evaporaron para dar 122 g del residuo (aproximadamente 90% de producto). El residuo se purificó en una columna de gel de sílice de 3,5 kg y se eluyó usando EtOAc/hexano (4:1). Las fracciones de producto puro se evaporaron para dar 96 g (84%). Se recuperaron 1,5 g adicionales de las últimas fracciones.

3'-O-Acetil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metil-4-triazoluridina

- Se preparó una primera disolución disolviendo 3'-O-acetil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metiluridina (96 g, 0,144 M) en CH_3CN (700 ml) y se dejó aparte. Se añadió trietilamina (189 ml, 1,44 M) a una disolución de triazol (90 g, 1,3 M) en CH_3CN (1 litro), se enfrió a -5°C y se agitó durante 0,5 h usando un agitador de varilla. Se añadió gota a gota POCl_3 a lo largo de un periodo de 30 min, a la disolución agitada mantenida a 0-10°C, y la mezcla resultante se agitó durante 2 h adicionales. Se añadió gota a gota la primera disolución, a lo largo de un periodo de 45 min, a esta última disolución. La mezcla de reacción resultante se almacenó durante la noche en una habitación fría. Las sales se filtraron de la mezcla de reacción y se evaporó la disolución. El residuo se disolvió en EtOAc (1 litro) y los sólidos insolubles se separaron por filtración. El filtrado se lavó con 1x300 ml de NaHCO_3 y 2x300 ml de disolución saturada de NaCl, se secó sobre sulfato magnésico y se evaporó. El residuo se trituró con EtOAc para dar el compuesto del título.

2'-O-Metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metilcitidina

- Una disolución de 3'-O-acetil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metil-4-triazoluridina (103 g, 0,141 M) en dioxano (500 ml) y NH_4OH (30 ml) se agitó durante 2 h. La disolución de dioxano se evaporó y el residuo se destiló azeotrópicamente con MeOH (2x200 ml). El residuo se disolvió en MeOH (300 ml) y se transfirió a un recipiente de presión de acero inoxidable de 2 litros. Se añadió MeOH (400 ml) saturado con NH_3 gaseoso y el recipiente se calentó a 100°C durante 2 h (la TLC mostró la conversión completa). El contenido del recipiente se evaporó hasta sequedad y el residuo se disolvió en EtOAc (500 ml) y se lavó una vez con disolución saturada de NaCl (200 ml). Las capas orgánicas se secaron sobre sulfato sódico y el disolvente se evaporó para dar 85 g (95%) del compuesto del título.

N4-benzoil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metil-citidina

- Se disolvió 2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metilcitidina (85 g, 0,134 M) en DMF (800 ml) y se añadió anhídrido benzoico (37,2 g, 0,165 M) con agitación. Después de agitar durante 3 h, la TLC mostraba que la reacción se había completado en aproximadamente 95%. El disolvente se evaporó y el residuo se destiló azeotrópicamente con MeOH (200 ml). El residuo se disolvió en CHCl_3 (700 ml) y se extrajo con disolución saturada de NaHCO_3 (2x300 ml) y disolución saturada de NaCl (2x300 ml), se secó sobre MgSO_4 y se evaporó para dar el residuo (96 g). El residuo se cromatografió en una columna de sílice de 1,5 kg usando EtOAc/hexano (1:1) que contenía Et_3NH al 0,5% como disolvente de elución. Las fracciones del producto puro se evaporaron para dar 90 g (90%) del compuesto del título.

N4-benzoil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metil-citidina-3'-amidita

- Se disolvió N4-benzoil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metilcitidina (74 g, 0,10 M) en CH_2Cl_2 (1 litro). Se añadieron tetrazol diisopropilamina (7,1 g) y 2-cianoetoxi-tetra-(isopropil)fosfito (40,5 ml, 0,123 M) con agitación en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 20 h a temperatura ambiente (la TLC mostró que la reacción se había completado en un 95%). La mezcla de reacción se extrajo con disolución saturada de NaHCO_3 (1x300 ml) y disolución saturada de NaCl (3x300 ml). Los lavados acuosos se volvieron a extraer con CH_2Cl_2 (300 ml), y los extractos se combinaron, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron. El residuo obtenido se cromatografió en una columna de sílice de 1,5 kg usando EtOAc/hexano (3:1) como disolvente de elución. Las fracciones puras del producto se combinaron para dar 90,6 g (87%) del compuesto del título.

2'-O-(Aminooxietil)-nucleósido-amiditas y 2'-O-(dimetilaminooxietil)-nucleósido-amiditas

2'-(Dimetilaminooxietoxi)-nucleósido-amiditas

- Las 2'-(dimetilaminooxietoxi)-nucleósido-amiditas [también conocidas en la técnica como 2'-O-(dimetilaminooxietil)-nucleósido-amiditas] se preparan como se describe en los siguientes párrafos. Las nucleósido-amiditas de adenosina, citidina y guanosina se preparan de forma similar a la timidina (5-metiluridina) excepto que las aminas

exocíclicas se protegen con un resto benzoilo en el caso de la adenosina y citidina y con un isobutirilo en el caso de la guanosina.

5'-O-*terc*-Butildifenilsilil-O²-2'-anhidro-5-metiluridina

Se disolvieron O²-2'-anhidro-5-metiluridina (Pro. Bio. Sint., Varese, Italia, 100,0 g, 0,416 mmol), dimetilaminopiridina (0,66 g, 0,013 eq, 0,0054 mmol) en piridina seca (500 ml) a temperatura ambiente en atmósfera de argón y con agitación mecánica. Se añadió *terc*-butildifenilclorosilano (125,8 g, 119,0 ml, 1,1 eq, 0,458 mmol) en una porción. La reacción se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La TLC (Rf 0,22, acetato de etilo) indicó una reacción completa. La disolución se concentró a presión reducida hasta un aceite espeso. Este se repartió entre diclorometano (1 litro) y disolución saturada de bicarbonato sódico (2x1 litro) y salmuera (1 litro). La capa orgánica se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida hasta un aceite espeso. El aceite se disolvió en una mezcla de acetato de etilo y éter dietílico 1:1 (600 ml) y la disolución se enfrió a -10°C. El producto cristalino resultante se recogió por filtración, se lavó con éter dietílico (3x200 ml) y se secó (40°C, 1 mm de Hg, 24 h) hasta 149 g (74,8%) de sólido blanco. La TLC y la RMN estaban de acuerdo con el producto puro.

5'-O-*terc*-Butildifenilsilil-2'-O-(2-hidroxietil)-5-metiluridina

En un reactor de presión sin agitación, de acero inoxidable de 2 litros, se añadió borano en tetrahidrofurano (1,0 M, 2,0 eq, 622 ml). En la campana extractora y con agitación manual, se añadió con cuidado primero etilenglicol (350 ml, exceso) hasta que disminuyó la evolución de hidrógeno gaseoso. Se añadieron 5'-O-*terc*-butildifenilsilil-O²-2'-anhidro-5-metiluridina (149 g, 0,311 mol) y bicarbonato sódico (0,074 g, 0,003 eq) con agitación manual. El reactor se cerró herméticamente y se calentó en un baño de aceite hasta que se alcanzó una temperatura interior de 160°C y después se mantuvo durante 16 h (presión < 7 kg/cm²). El recipiente de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se abrió. La TLC (Rf 0,67 para el producto deseado y Rf 0,82 para el producto secundario ara-T, acetato de etilo) indicaba una conversión al producto de aproximadamente 70%. Con el fin de evitar la formación de producto secundario adicional, se detuvo la reacción, se concentró a presión reducida (de 10 a 1 mm de Hg) en un baño de agua caliente (40-100°C) con las condiciones más extremas usadas para separar el etilenglicol. [Alternativamente, una vez que el disolvente de bajo punto de ebullición se ha separado, la disolución que queda se puede repartir entre acetato de etilo y agua. El producto estará en la fase orgánica]. El residuo se purificó por cromatografía en columna (2 kg de gel de sílice, gradiente de acetato de etilo-hexano de 1:1 a 4:1). Se combinaron las fracciones adecuadas, se separaron los productos volátiles y se secaron para dar el producto en forma de una espuma blanca crujiente (84 g, 50%), material de partida contaminado (17,4 g) y material de partida puro reutilizable 20 g. El rendimiento basado en el material de partida menos puro recuperado era de 58%. La TLC y la RMN estaban de acuerdo con 99% de producto puro.

2'-O-([2-ftalimidoxi)etil]-5'-*t*-butildifenilsilil-5-metiluridina

Se mezcló la 5'-O-*terc*-butildifenilsilil-2'-O-(2-hidroxietil)-5-metiluridina (20 g, 36,98 mmol) con trifenilfosfina (11,63 g, 44,36 mmol) y N-hidroxiftalimida (7,24 g, 44,36 mmol). Después se secó sobre P₂O₅ con alto vacío durante dos días a 40°C. La mezcla de reacción se barrió con argón y se añadió THF seco (369,8 ml, Aldrich, botella con cierre hermético seguro) para dar una disolución transparente. Se añadió gota a gota azodicarboxilato de dietilo (6,98 ml, 44,36 mmol) a la mezcla de reacción. La velocidad de adición se mantiene de forma que la coloración rojo oscuro resultante acaba de bajar antes de añadir la siguiente gota. Tras completarse la adición, la reacción se agitó durante 4 h. En ese momento, la TLC mostró que la reacción se había completado (acetato de etilo:hexano, 60:40). El disolvente se evaporó a vacío. El residuo obtenido se puso en una columna ultrarrápida con acetato de etilo:hexano (60:40), para dar la 2'-O-([2-ftalimidoxi)etil]-5'-*t*-butildifenilsilil-5-metiluridina en forma de una espuma blanca (21,819 g, 86%).

5'-O-*terc*-Butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadoximinooxi)etil]-5-metiluridina

Se disolvió 2'-O-([2-ftalimidoxi)etil]-5'-*t*-butildifenilsilil-5-metiluridina (3,1 g, 4,5 mmol) en CH₂Cl₂ seco (4,5 ml) y se añadió gota a gota metilhidrazina (300 ml, 4,64 mmol) de -10°C a 0°C. Después de 1 h, la mezcla se filtró, el filtrado se lavó con CH₂Cl₂ enfriado con hielo y las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. La disolución se concentró para dar la 2'-O-(aminooxi)timidina, que después se disolvió en MeOH (67,5 ml). A esta se le añadió formaldehído (disolución acuosa al 20%, 1,1 eq.) y la mezcla resultante se agitó durante 1 h. El disolvente se separó a vacío; el residuo se cromatografió para dar la 5'-O-*terc*-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadoximinooxi)etil]-5-metiluridina en forma de una espuma blanca (1,95 g, 78%).

5'-O-*terc*-butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxi)etil]-5-metiluridina

Se disolvió la 5'-O-*terc*-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadoximinooxi)etil]-5-metiluridina (1,77 g, 3,12 mmol) en una disolución de p-toluenosulfonato de piridinio 1 M (PPTS) en MeOH seco (30,6 ml). Se añadió cianoborohidruro sódico (0,39 g, 6,13 mmol) a esta disolución a 10°C en atmósfera inerte. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a 10°C. Después de esto, el recipiente de reacción se retiró del baño de hielo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, la reacción se siguió por TLC (MeOH al 5% en CH₂Cl₂). Se añadió disolución acuosa de NaHCO₃ (al 5%, 10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x20 ml). La fase de acetato de etilo se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en una disolución de PPTS 1 M en MeOH (30,6 ml). Se

añadió formaldehído (al 20% en p/p, 30 ml, 3,37 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla de reacción se enfrió a 10°C en un baño de hielo, se añadió cianoborohidruro sódico (0,39 g, 6,13 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 10°C durante 10 min. Después de 10 min, la mezcla de reacción se retiró del baño de hielo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió a la mezcla de reacción disolución de NaHCO₃ al 5% (25 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x25 ml). La capa de acetato de etilo se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida y se eluyó con MeOH al 5% en CH₂Cl₂ para dar la 5'-O-*terc*-butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxietil]-5-metiluridina en forma de una espuma blanca (14,6 g, 80%).

2'-O-(Dimetilaminooxietil)-5-metiluridina

Se disolvió trihidrofluoruro de trietilamina (3,91 ml, 24,0 mmol) en THF seco y trietilamina (1,67 ml, 12 mmol, seco, conservado sobre KOH). Después, la mezcla de trietilamina-2HF se añadió a la 5'-O-*terc*-butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxietil]-5-metiluridina (1,40 g, 2,4 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se siguió por TLC (MeOH al 5% en CH₂Cl₂). El disolvente se separó a vacío y el residuo se puso en una columna ultrarrápida con MeOH al 10% en CH₂Cl₂ para dar la 2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina (766 mg, 92,5%).

5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina

La 2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina (750 mg, 2,17 mmol) se secó sobre P₂O₅ con alto vacío durante la noche a 40°C. Después se coevaporó con piridina anhidra (20 ml). El residuo obtenido se disolvió en piridina (11 ml) en atmósfera de argón. Se añadieron 4-dimetilaminopiridina (26,5 mg, 2,60 mmol), cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (880 mg, 2,60 mmol) a la mezcla y la reacción se agitó a temperatura ambiente hasta que todo el material de partida había desaparecido. La piridina se separó a vacío y el residuo se cromatografió y se eluyó con MeOH al 10% en CH₂Cl₂ (que contenía unas gotas de piridina) para dar la 5'-O-DMT-2'-O-(dimetilamino-oxietil)-5-metiluridina (1,13 g, 80%).

5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimetilaminooxietil)-5-metiluridina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita]

La 5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina (1,08 g, 1,67 mmol) se coevaporó con tolueno (20 ml). Al residuo se le añadió N,N-diisopropilamina tetrazónido (0,29 g, 1,67 mmol) y se secó sobre P₂O₅ con alto vacío durante la noche a 40°C. Después la mezcla de reacción se disolvió en acetonitrilo anhidro (8,4 ml) y se añadió 2-cianoetil-N,N,N¹,N¹-tetraisopropilfosforamidita (2,12 ml, 6,08 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h en atmósfera inerte. La evolución de la reacción se siguió por TLC (hexano:acetato de etilo 1:1). El disolvente se evaporó, después el residuo se disolvió en acetato de etilo (70 ml) y se lavó con disolución acuosa de NaHCO₃ al 5% (40 ml). La capa de acetato de etilo se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró. El residuo obtenido se cromatografió (acetato de etilo como eluyente) para dar la 5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimetilaminooxietil)-5-metiluridina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita] en forma de una espuma (1,04 g, 74,9%).

2'-(Aminooxietoxi)-nucleósido-amiditas

Las 2'-(aminooxietoxi)-nucleósido-amiditas [también conocidas en la técnica como 2'-O-(aminooxietil)-nucleósido-amiditas] se preparan como se describe en los siguientes párrafos. Las nucleósido-amiditas de adenosina, citidina y timidina se preparan como sigue.

N2-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita]

El análogo de 2'-O-aminooxietil-guanosina se puede obtener por 2'-O-alkilación selectiva de la diaminopurina-ribósido. Se pueden adquirir cantidades de multigramos de diaminopurina-ribósido en Schering AG (Berlín) para proporcionar la 2'-O-(2-etilacetil)-diaminopurina-ribósido junto con una cantidad minoritaria del isómero 3'. El 2'-O-(2-etilacetil)-diaminopurina-ribósido se puede resolver y convertir en la 2'-O-(2-etilacetil)guanosina por tratamiento con adenosina desaminasa. (McGee, D. P. C., Cook, P. D., Guinasso, C. J., publicación internacional WO 94/02501 A1 940203.) Los procedimientos de protección convencionales darían la 2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina y la 2-N-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina que se puede reducir para dar la 2-N-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-(2-hidroxietil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina. Como antes, el grupo hidroxilo se puede desplazar mediante la N-hidroxitfalimida por una reacción de Mitsunobu, y se puede formar la fosforamidita del nucleósido protegido de la forma habitual para dar la 2-N-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-[(2-ftalimidoxi)etil]-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita].

2'-dimetilaminoetoxietoxi (2'-DMAEOE)-nucleósido-amiditas

Las 2'-dimetilaminoetoxietoxi-nucleósido-amiditas (también conocidas en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo, es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N-(CH₂)₂, o 2'-DMAEOE-nucleósido-amiditas) se preparan como sigue. Otras nucleósido-amiditas se preparan de forma similar.

2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)etil]-5-metil-uridina

El 2[2-(dimetilamino)etoxi]etanol (Aldrich, 6,66 g, 50 mmol) se añade lentamente a una disolución de borano en tetrahidrofurano (1 M, 10 ml, 10 mmol) con agitación en una bomba de 100 ml. Al disolverse el sólido evoluciona hidrógeno gaseoso. Se añaden O^{2-} , 2'-anhidro-5-metiluridina (1,2 g, 5 mmol) y bicarbonato sódico (2,5 mg) y la bomba se cierra herméticamente, se pone en un baño de aceite y se calienta a 155°C durante 26 h. La bomba se enfría a temperatura ambiente. La disolución bruta se concentra y el residuo se reparte entre agua (200 ml) y hexanos (200 ml). El exceso de fenol se extrae en la capa de hexano. La capa acuosa se extrae con acetato de etilo (3x200 ml) y las capas orgánicas combinadas se lavan una vez con agua, se secan sobre sulfato sódico anhidro y se concentran. El residuo se pasa por una columna de gel de sílice usando metanol/cloruro de metileno 1:20 (que tenía 2% de trietilamina) como eluyente. Al concentrar las fracciones de la columna, se forma un sólido incoloro que se recoge para dar el compuesto del título en forma de un sólido blanco.

5'-O-Dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metil-uridina

A 0,5 g (1,3 mmol) de 2'-O-[2(2-N,N-dimetilamino-etoxi)etil]-5-metil-uridina en piridina anhidra (8 ml), se añaden trietilamina (0,36 ml) y cloruro de dimetoxitritilo (DMT-Cl, 0,87 g, 2 eq.) y se agita durante 1 h. La mezcla de reacción se vierte en agua (200 ml) y se extrae con CH_2Cl_2 (2x200 ml). Las capas de CH_2Cl_2 combinadas se lavan con disolución saturada de $NaHCO_3$, seguido de disolución saturada de NaCl y se secan sobre sulfato sódico anhidro. La evaporación del disolvente seguido de cromatografía en gel de sílice usando MeOH: CH_2Cl_2 :Et₃N (20:1, v/v, con 1% de trietilamina) da el compuesto del título.

5'-O-Dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metil-uridina-3'-O-(cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita

Se añaden diisopropilaminotetrazórido (0,6 g) y 2-cianoetoxi-N,N-diisopropil-fosforamidita (1,1 ml, 2 eq.) a una disolución de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)etil]-5-metiluridina (2,17 g, 3 mmol) disuelta en CH_2Cl_2 (20 ml) en atmósfera de argón. La mezcla de reacción se agita durante la noche y se evapora el disolvente. El residuo resultante se purifica por cromatografía en columna ultrarrápida de gel de sílice con acetato de etilo como eluyente para dar el compuesto del título.

Ejemplo 2

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos no sustituidos y sustituidos con fosfodiéster (P=O) se sintetizan en un sintetizador de ADN automático (Applied Biosystems modelo 380B) usando la química convencional de la fosforamidita con oxidación por yodo.

Los fosforotioatos (P=S) se sintetizan como los oligonucleótidos fosfodiéster excepto que la botella de oxidación estándar se substituyó por disolución de 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona 0,2 M en acetonitrilo para la tiación escalonada de los enlaces fosfito. La etapa de espera de la tiación se aumentó a 68 s y le siguió la etapa de rematado. Después de escisión de la columna de CPG y desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55°C (18 h), los oligonucleótidos se purificaron por precipitación dos veces con 2,5 volúmenes de etanol a partir de una disolución de NaCl 0,5 M. Los fosfinatos de oligonucleótidos se preparan como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.508.270.

Los alquifosfonatos de oligonucleótidos se preparan como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.469.863.

Los 3'-desoxi-3'-metilen-fosfonatos de oligonucleótidos se preparan como se describe en las patentes de EE.UU. nº 5.610.289 o 5.625.050.

Las fosforamiditas de oligonucleótidos se preparan como se describe en la patente de EE.UU. 5.256.775 o patente de EE.UU. 5.366.878.

Los alquifosfonotioato de oligonucleótidos se preparan como se describe en las solicitudes PCT publicadas PCT/US94/00902 y PCT/US93/06976 (publicadas como WO 94/17093 y WO 94/02499, respectivamente).

Los 3'-desoxi-3'-amino-fosforamidatos de oligonucleótidos se preparan como se describe en la patente de EE.UU. 5.476.925.

Los fosfotriéster de oligonucleótidos se preparan como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.023.243.

Los borano-fosfatos de oligonucleótidos se preparan como se describe en las patentes de EE.UU. 5.130.302 y 5.177.198.

Ejemplo 3

Síntesis de oligonucleósidos

Los oligonucleósidos unidos a metilenmetilimino, también identificados como oligonucleósidos unidos a MMI, oligonucleósidos unidos a metilendimetilhidrazo, también identificados como oligonucleósidos unidos a MDH, y oligonucleósidos unidos a metilencarbonilamino, también identificados como oligonucleósidos unidos a amida-3, y oligonucleósidos unidos a metilaminocarbonilo, también identificados como oligonucleósidos unidos a amida-4, así como compuestos de cadena principal mixta que tienen, por ejemplo, uniones que alternan MMI y P=O o P=S se preparan como se describe en las patentes de EE.UU. 5.378.825, 5.386.023, 5.489.677, 5.602.240 y 5.610.289.

Los oligonucleósidos unidos a formacetal y tioformacetal se preparan como se describe en las patentes de EE.UU. 5.264.562 y 5.264.564.

Los oligonucleósidos unidos a óxido de etileno se preparan como se describe en la patente de EE.UU. 5.223.618.

Ejemplo 4

Síntesis de PNA

Los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) se preparan de acuerdo con cualquiera de diferentes procedimientos citados en Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23. También se pueden preparar de acuerdo con las patentes de EE.UU. 5.539.082, 5.700.922, y 5.719.262.

Ejemplo 5

Síntesis de oligonucleótidos quiméricos

Los oligonucleótidos, oligonucleósidos u oligonucleótidos/oligonucleósidos mixtos quiméricos de la invención pueden ser de varios tipos. Estos incluyen un primer tipo en el que el segmento "hueco" de los nucleósidos ligados se sitúa entre los segmentos ala de 5' y 3' de nucleósidos unidos y un segundo tipo de "extremo abierto" en donde el segmento "hueco" se encuentra en el extremo, ya sea 3' o 5' terminal del compuesto oligomérico. Los oligonucleótidos del primer tipo también se conocen en la técnica como "gápmers" u oligonucleótidos con hueco. Los oligonucleótidos del segundo tipo se conocen también en la técnica como "hemímeros" o "alámeros".

[2'-O-Me]-[2'-desoxi]-[2'-O-Me] Oligonucleótidos fosforotioatos quiméricos

Los oligonucleótidos quiméricos que tienen segmentos de oligonucleótido 2'-O-alkil-fosforotioato y 2'-desoxi-fosforotioato se sintetizan usando un sintetizador de ADN automático Applied Biosystems modelo 380B, como antes. Los oligonucleótidos se sintetizan usando el sintetizador automático y la 2'-desoxi-5'-dimetoxitritil-3'-O-fosforamidita para la parte de ADN y la 5'-dimetoxitritil-2'-O-metil-3'-O-fosforamidita para las alas 5' y 3'. El ciclo de síntesis convencional se modifica aumentando la etapa de espera después del suministro de tetrazol y base a 600 s, repetido cuatro veces para el ARN y dos veces para el 2'-O-metilo. El oligonucleótido completamente protegido se escinde del soporte y el grupo fosfato se desprotege en amoniaco/etanol 3:1 a temperatura ambiente durante la noche y después se liofiliza hasta sequedad. Después se hace el tratamiento en amoniaco metanólico durante 24 h a temperatura ambiente para desproteger todas las bases y la muestra se liofiliza hasta sequedad otra vez. El sedimento se vuelve a suspender en TBAF 1 M en THF durante 24 h a temperatura ambiente para desproteger las posiciones 2'. Después, la reacción se inactiva con TEAA 1 M y después la muestra se reduce a 1/2 de volumen mediante Rotavac antes de desalar en una columna de exclusión por tamaños G25. Después se analiza en el oligómero recuperado por espectrofotometría el rendimiento y la pureza por electroforesis capilar y espectrometría de masas.

[2'-O-(2-Metoxietil)]-[2'-desoxi]-(2'-O-(metoxietil))-oligonucleótidos fosforotioatos quiméricos

Los [2'-O-(2-metoxietil)]-[2'-desoxi]-(2'-O-(metoxietil))-oligonucleótidos fosforotioato quiméricos se prepararon igual que el procedimiento anterior para el 2'-O-metil-oligonucleótido quimérico, sustituyendo las 2'-O-metil-amiditas por 2'-O-(metoxietil)-amiditas.

[2'-O-(2-Metoxietil)fosfodiéster]-[2'-desoxi-fosforotioato]-[2'-O-(2-metoxietil)-fosfodiéster]-oligonucleótidos quiméricos

Los [2'-O-(2-metoxietil-fosfodiéster)]-[2'-desoxi fosforotioato]-[2'-O-(metoxietil)-fosfodiéster]-oligonucleótidos quiméricos se preparan igual que por el procedimiento anterior para los 2'-O-metil-oligonucleótidos quiméricos sustituyendo las 2'-O-metil-amiditas por 2'-O-(metoxietil)-amiditas, oxidación con yodo para generar los enlaces internucleótidos fosfodiéster dentro de las partes de ala para las estructuras quiméricas y sulfuración usando 1,1-dióxido de 3,4,1,2-benzoditiol-3-ona (Beaucage Reagent) para generar los enlaces internucleótidos fosforotioato para la región interna del centro.

Otros oligonucleótidos quiméricos, oligonucleósidos quiméricos y oligonucleótidos/oligonucleósidos mixtos quiméricos se sintetizan de acuerdo con la patente de Estados Unidos 5.623.065.

Ejemplo 6

Aislamiento de oligonucleótidos

- 5 Tras la escisión de la columna de vidrio de poros controlados (Applied Biosystems) y el desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55°C durante 18 h, los oligonucleótidos u oligonucleósidos se purifican por precipitación dos veces en NaCl 0,5 M con 2,5 volúmenes de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en geles desnaturalizantes y se consideró que al menos 85% era material de longitud completa. Las cantidades relativas de enlaces fosforotioato y fosfodiéster obtenidos se comprobó periódicamente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ³¹P, y para algunos estudios los oligonucleótidos se purificaron por HPLC como describen Chiang et al., *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 18162-18171. Los resultados obtenidos con el material purificado por HPLC eran similares a los obtenidos con el material no purificado por HPLC.

Ejemplo 7

Síntesis de oligonucleótidos - Formato de placa de 96 pocillos

- 15 Los oligonucleótidos se sintetizaron mediante la química de la fosforamidita P(III) en fase sólida en un sintetizador automático capaz de ensamblar 96 secuencias simultáneamente en un formato de 96 pocillos estándar. Los enlaces internucleótidos fosfodiéster se proporcionaron por oxidación con yodo acuoso. Los enlaces internucleótidos fosforotioato se generaron por sulfuración usando 1,1-dióxido de 3,4-dihidro-2H-benzoditio-3-ona (Beaucage Reagent) en acetonitrilo anhidro. Las beta-cianoetil-diisopropil-fosforamiditas con base protegida convencionales se adquirieron en proveedores comerciales (p. ej. PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, o Pharmacia, Piscataway, NJ). Los nucleósidos no convencionales se sintetizan por métodos patentados o conocidos de la bibliografía. Se usan como las beta-cianoetil-diisopropil-fosforamiditas de base protegida.

- 20 Los oligonucleótidos se escindieron del soporte y se desprotegeron con NH₄OH concentrado a temperatura elevada (55-60°C) durante 12-16 h y después el producto liberado se secó a vacío. Después, el producto seco se volvió a suspender en agua estéril para dar una placa madre, a partir de la cual se diluyen todas las muestras de placa analíticas y de ensayo usando pipetas robóticas.

Ejemplo 8

Análisis de oligonucleótidos - Formato de placa de 96 pocillos

- 30 La concentración de oligonucleótidos en cada pocillo se evaluó por dilución de las muestras y espectroscopía de absorción UV. La integridad de la longitud completa de los productos individuales se evaluó por electroforesis capilar (CE) en el formato de 96 pocillos (Beckman P/ACE™ NDQ) o, para las muestras preparadas individualmente, en un aparato comercial de CE (p. ej., Beckman P/ACE™ 5000, ABI 270). La composición de bases y de la cadena principal se confirmó por análisis de masas de los compuestos usando espectroscopía de masas por electropulverización. Todas las placas de ensayo se diluyeron a partir de la placa madre usando pipetas robóticas de un canal y múltiples canales. Se consideró que las placas eran aceptables si al menos 85% de los compuestos de la placa eran al menos 85% de la longitud completa.

Ejemplo 9

Cultivo celular y tratamiento de oligonucleótidos

- 40 El efecto de los compuestos antisentido en la expresión del ácido nucleico diana se puede ensayar en cualquiera de una variedad de tipos de células, con la condición de que el ácido nucleico diana esté presente en niveles medibles. Esto se puede determinar de forma rutinaria usando, por ejemplo PCR o análisis de transferencia Northern. Los siguientes 7 tipos de células se proporcionan solo con propósitos ilustrativos, pero se pueden usar rutinariamente otros tipos de células, con la condición de que la diana sea expresada en el tipo de célula elegido. Esto se puede determinar fácilmente por métodos rutinarios en la técnica, por ejemplo, análisis de transferencia Northern, ensayos de protección de ribonucleasa, o RT-PCR.

Células T-24:

- 50 La línea celular de carcinoma de células transicionales de vejiga humanas T-24 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Las células T-24 se cultivaron de forma rutinaria en medio basal completo McCoy 5A (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con suero de ternero fetal al 10% (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD), penicilina 100 unidades por ml, y estreptomycin 100 microgramos por ml (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Se realizaron pases de las células de forma rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria nº 3872) con una densidad de 7000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR.

Para los análisis de transferencia Northern y otros análisis, las células se pueden sembrar en placas de tejido tisular de 100 mm u otras convencionales y tratar de forma similar, usando volúmenes de medio y el oligonucleótido adecuados.

Células A549:

- 5 La línea celular de carcinoma de pulmón humano A549 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Las células A549 se cultivaron de forma rutinaria en medio basal DMEM (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con suero de ternero fetal al 10% (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD), penicilina 100 unidades por ml y estreptomina 100 microgramos por ml (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Se realizaron pases de las células de forma rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia.

Células NHDF:

- 15 Los fibroblastos dérmicos neonatales humanos (NHDF) se obtuvieron de Clonetics Corporation (Walkersville MD). Las NHDF se mantuvieron de forma rutinaria en medio de crecimiento de fibroblastos (Clonetics Corporation, Walkersville MD) complementado como recomienda el proveedor. Las células se mantuvieron hasta 10 pases según recomendaba el proveedor.

Células HEK:

- 20 Los queratinocitos embrionarios humanos (HEK) se obtuvieron de Clonetics Corporation (Walkersville MD). Los HEK se mantuvieron de forma rutinaria en medio de crecimiento de queratinocitos (Clonetics Corporation, Walkersville MD) formulado como recomendaba el proveedor. Las células se mantuvieron de forma rutinaria hasta 10 pases según recomendaba el proveedor.

Células HepG2:

- 25 La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células HepG2 se cultivaron de forma rutinaria en MEM de Eagle complementado con suero de ternero fetal al 10%, aminoácidos no esenciales y piruvato sódico 1 mM (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Se realizaron pases de las células de forma rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria nº 3872) con una densidad de 7000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR.

- 30 Para los análisis de transferencia Northern u otros análisis, las células se pueden sembrar en placas de tejido tisular de 100 mm u otras convencionales y tratar de forma similar, usando volúmenes de medio y el oligonucleótido adecuados.

Células AML12:

- 35 La línea celular AML12 (hepática de ratón alfa 12) se estableció a partir de hepatocitos de un ratón (cepa CD1, línea MT42) transgénico para TGF alfa humano. Las células se cultivan en una mezcla 1:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco y medio F12 de Ham con insulina 0,005 mg/ml, transferrina 0,005 mg/ml, selenio 5 ng/ml, y dexametasona 40 ng/ml, y 90%; suero bovino fetal al 10%. Para el subcultivo, el medio gastado se separa y se añade medio reciente de disolución de tripsina al 0,25%, EDTA al 0,03%. Se añade disolución de tripsina reciente (de 1 a 2 ml) y el cultivo se deja asentar a temperatura ambiente hasta que las células se desprenden.

- 40 Se realizaron pases de las células de forma rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria nº 3872) con una densidad de 7000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR.

Para los análisis de transferencia Northern u otros análisis, las células se pueden sembrar en placas de tejido tisular de 100 mm u otras convencionales y tratar de forma similar, usando volúmenes de medio y el oligonucleótido adecuados.

Hepatocitos primarios de ratón:

- 45 Los hepatocitos primarios de ratón se prepararon a partir de ratones CD-1 adquiridos en Charles River Labs (Wilmington, MA) y se cultivaron de forma rutinaria en medio de adherencia de hepatocitos (Gibco) complementado con suero bovino fetal al 10% (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD), dexametasona 250 nM (Sigma), e insulina 10 nM (Sigma). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria nº 3872) con una densidad de 10000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR.

- 50 Para el análisis por transferencia Northern u otros análisis, las células se cultivan en placas de cultivo celular de 100 mm u otras convencionales recubiertas con colágeno de cola de rata (200 ug/ml) (Becton Dickinson) y se tratan de forma similar usando los volúmenes de medio y el oligonucleótido adecuados.

Células Hep3B:

La línea celular de carcinoma hepatocelular humano Hep3B se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células Hep3B se cultivaron de forma rutinaria en MEM de Dulbeccos con alto contenido en glucosa complementado con suero de ternero fetal al 10%, L-glutamina e hidrocloreuro de piridoxina (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Se realizaron pases de las células de forma rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Falcon-Primaria nº 3846) con una densidad de 50.000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR.

Para los análisis de transferencia Northern u otros análisis, las células se pueden sembrar en placas de tejido tisular de 100 mm u otras convencionales y tratar de forma similar, usando volúmenes de medio y el oligonucleótido adecuados.

Hepatocitos primarios de conejo:

Los hepatocitos primarios de conejo se adquirieron en Invitro Technologies (Gaithersburg, MD) y se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (Gibco). Cuando se adquirieron, las células se habían sembrado en placas de 96 pocillos para usar en análisis de RT-PCR y eran confluentes.

Para los análisis de transferencia Northern u otros análisis, las células se pueden sembrar en placas de tejido tisular de 100 mm u otras convencionales y tratar de forma similar, usando volúmenes de medio y el oligonucleótido adecuados.

Células HeLa:

La línea celular de carcinoma epiteloide HeLa se obtuvo de la American Tissue Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células HeLa se cultivaron de forma rutinaria en DMEM, con alto contenido de glucosa (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (Falcon-Primaria nº 3846) con una densidad de 50.000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR. Se realizaron pases de las células de forma rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria nº 3872) con una densidad de 5.000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR. Para los análisis de transferencia Northern u otros análisis, las células se pueden sembrar en placas de tejido tisular de 100 mm u otras convencionales y tratar de forma similar, usando volúmenes de medio y el oligonucleótido adecuados.

Células epiteliales mamarias humanas:

Las células epiteliales mamarias humanas normales (HMEC) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Manassas VA). Las HMEC se cultivaron de forma rutinaria en DMEM con bajo contenido en glucosa (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con suero de ternero fetal al 10% (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Se realizaron pases de las células de forma rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria nº 353872, BD Biosciences, Bedford, MA) con una densidad de 7000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR. Para los análisis de transferencia Northern u otros análisis, las células se pueden sembrar en placas de tejido tisular de 100 mm u otras convencionales y tratar de forma similar, usando volúmenes de medio y el oligonucleótido adecuados.

Tratamiento con compuestos antisentido:

Cuando las células alcanzaron 80% de confluencia, se trataron con el oligonucleótido. Para las células cultivadas en placas de 96 pocillos, los pocillos se lavaron una vez con 200 µl de medio OPTI-MEM™ -1 reducido en suero (Gibco BRL) y se trataron con 130 µl de OPTI-MEM™ -1 que contenían 3,75 µg/ml de LIPOFECTIN™ (Gibco BRL) y la concentración deseada del oligonucleótido. Después de 4-7 h de tratamiento, el medio se sustituyó por medio de nueva aportación. Las células se recogieron 16-24 h después del tratamiento con oligonucleótido.

La concentración del oligonucleótido usado varía de una línea celular a otra. Para determinar la concentración óptima de oligonucleótido para una línea celular particular, las células se trataron con un oligonucleótido de control positivo en un intervalo de concentraciones. Para células humanas el oligonucleótido de control positivo es ISIS 13920, TCCGTCATCGCTCCTCAGGG, SEQ ID NO: 1, un 2'-O-metoxietil-gápmo (los 2'-O-metoxietilos se muestran en negrita) con una cadena principal de fosforotioato que se dirige a H-ras humano. Para células de ratón o rata el oligonucleótido de control positivo es ISIS 15770, ATGCATTCTGCCCCAAGGA, SEQ ID NO: 2, un 2'-O-metoxietil-gápmo (los 2'-O-metoxietilos se muestran en negrita) con una cadena principal de fosforotioato que se dirige a c-raf tanto de ratón como de rata. La concentración del oligonucleótido de control positivo que da como resultado 80% de inhibición del ARNm de c-Ha-ras (para ISIS 13920) o c-raf (para ISIS 15770) se usa entonces como concentración de cribado para nuevos oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se alcanza el 80% de inhibición, se usa entonces la concentración más baja del oligonucleótido de control positivo que da como resultado 60% de inhibición del ARNm de H-ras o c-raf, como concentración de cribado de oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se alcanza el 60% de inhibición, se

considera que esa línea celular particular no es adecuada para los experimentos de transfección de oligonucleótidos. Las concentraciones de oligonucleótidos antisentido usadas en la presente memoria son de 5 nM a 300 nM.

Ejemplo 10

Análisis de la inhibición por el oligonucleótido de la expresión de la apolipoproteína B

5 La modulación antisentido de la expresión de la apolipoproteína B se puede ensayar en una variedad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm de la apolipoproteína B se pueden cuantificar por, p. ej., análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa competitiva (PCR) o PCR en tiempo real (RT-PCR). Actualmente se prefiere la PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de ARN se puede realizar en el ARN celular total o poli(A)+ ARNm. Los métodos de aislamiento del ARN se enseñan, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 1, pp. 4.1.1-4.2.9 y 4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993. El análisis Northern es rutinario en la técnica y se enseña, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 1, pp. 4.2.1-4.2.9, John Wiley & Sons, Inc., 1996. La (PCR) cuantitativa en tiempo real se puede llevar a cabo de forma conveniente usando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM™ 7700 disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, y usarlo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles de proteína de la apolipoproteína B se pueden cuantificar en una variedad de formas bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ELISA o separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos contra la apolipoproteína B se pueden identificar y obtener a partir de una variedad de fuentes, tales como el catálogo MSRS de anticuerpos (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o se pueden preparar por métodos convencionales de generación de anticuerpos. Los métodos para preparar antisueros policlonales se enseñan, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 11.12.1-11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997. La preparación de anticuerpos monoclonales se enseña, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 11.4.1-11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997.

Los métodos de inmunoprecipitación son convencionales en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998. El análisis de transferencia Western (inmunotransferencia) es convencional en la técnica y se puede encontrar, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 10.8.1-10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1997. Los ensayos de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) son convencionales en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 2, pp. 11.2.1-11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991.

Ejemplo 11

Aislamiento de poli(A)+ ARNm

El poli(A)+ ARNm se aisló de acuerdo con Miura et al., *Clin. Chem.*, 1996, 42, 1758-1764. Se enseñan otros métodos de aislamiento de poli(A)+ ARNm, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Volumen 1, pp. 4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993. Brevemente, para cultivar células en placas de 96 pocillos, se eliminó el medio de crecimiento de las células y cada pocillo se lavó con 200 µl de PBS frío. Se añadieron 60 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM a pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,5 M, NP-40 al 0,5%, complejo de vanadil-ribonucleósido 20 mM) a cada pocillo, la placa se agitó suavemente y después se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se transfirieron 55 µl de lisato a placas de 96 pocillos recubiertas con Oligo d(T) (AGCT Inc., Irvine CA). Las placas se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con 200 µl de tampón de lavado (Tris-HCl 10 mM a pH 7,6, EDTA 1 mM, NaCl 0,3 M). Después del lavado final, la placa se transfirió a toallas de papel para separar el exceso de tampón de lavado y se secaron al aire durante 5 min. Se añadieron a cada pocillos 60 µl de tampón de elución (Tris-HCl 5 mM a pH 7,6), precalentado a 70°C, la placa se incubó en una placa caliente a 90°C durante 5 min, y después el eluato se transfirió a una placa nueva de 96 pocillos.

Las células cultivadas en placas de 100 mm u otras convencionales se pueden tratar de forma similar, usando volúmenes adecuados de todas las disoluciones.

Ejemplo 12

50 Aislamiento de ARN total

El ARN total se aisló usando el kit RNEASY 96™ y tampones adquiridos en Qiagen Inc. (Valencia CA) siguiendo los procedimientos descritos por el fabricante. Brevemente, para cultivar células en placas de 96 pocillos, se eliminó el medio de crecimiento de las células y cada pocillo se lavó con 200 µl de PBS frío. Se añadieron 100 µl de tampón RLT a cada pocillo y la placa se agitó enérgicamente durante 20 segundos. Después se añadieron 100 µl de etanol al 70% a cada pocillo y el contenido se mezcló cargando y descargando la pipeta 3 veces. Después las muestras se transfirieron a la placa de 96 pocillos RNEASY 96™ unida a un colector QIAVAC™ equipado con una bandeja de

recolección de residuos unida a una fuente de vacío. Se aplicó vacío durante 15 s. Se añadió 1 ml de tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se volvió a aplicar el vacío durante 15 segundos. Después, se añadió 1 ml de tampón RPE a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplicó el vacío durante un periodo de 15 segundos. Después se repitió el lavado con RPE y se aplicó vacío durante 10 min adicionales. Después se retiró la placa del colector QIAVAC™ y se transfirió en seco sobre toallas de papel. Después, la placa se volvió a unir al colector QIAVAC™ equipado con una rejilla con una rejilla de tubos de recolección que contenía tubos de recolección de 1,2 ml. El ARN después se eluyó añadiendo con pipeta 60 µl de agua en cada pocillo, incubando durante 1 min y después aplicando el vacío durante 30 segundos. La etapa de elución se repitió con 60 µl adicionales de agua.

Las etapas de pipeteo y elución repetitivas se pueden automatizar con un equipo QIAGEN Bio-Robot 9604 (Qiagen, Inc., Valencia CA). Esencialmente, después de la lisis de las células en la placa de cultivo, la placa se transfiere a la plataforma del robot donde se llevan a cabo las etapas de pipeteo, tratamiento con DNasa y elución.

Ejemplo 13

Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B

La cuantificación de los niveles de ARNm de apolipoproteína B se determinaron usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM™ 7700 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este es un sistema de detección de fluorescencia, no basado en gel, en tubo cerrado, que permite la cuantificación de alta capacidad de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. A diferencia de la PCR convencional, en la que los productos de amplificación son cuantificados después de completarse la PCR, los productos en la PCR cuantitativa en tiempo real son cuantificados cuando se acumulan. Esto se lleva a cabo incluyendo en la reacción de la PCR una sonda de oligonucleótido que se reasocia específicamente entre los cebadores de la PCR directo e inverso, y contiene dos colorantes fluorescentes. Un colorante indicador (p. ej., JOE, FAM, o VIC, obtenido de Operon Technologies Inc., Alameda, CA o PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) se une al extremo 5' de la sonda y un colorante atenuador (p. ej., TAMRA, obtenido de Operon Technologies Inc., Alameda, CA o PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) se une al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda y el colorante están intactos, la emisión del colorante indicador es atenuada por la proximidad del colorante atenuador de 3'. Durante la amplificación, la reasociación de la sonda con la secuencia diana crea un sustrato que puede ser escindido por la actividad de 5'-exonucleasa de la polimerasa Taq. Durante la fase de extensión del ciclo de amplificación de la PCR, la escisión de la sonda por la polimerasa Taq libera el colorante indicador del resto de la sonda (y por lo tanto el resto atenuador) y se genera una señal fluorescente específica de la secuencia. Con cada ciclo, son escindidas moléculas indicadoras adicionales de sus respectivas sondas, y se controla la intensidad de la fluorescencia a intervalos regulares mediante óptica láser incorporada en el sistema de detección de secuencias ABI PRISM™ 7700. En cada ensayo, una serie de reacciones paralelas que contienen diluciones seriadas de ARNm de muestras de control no tratadas genera una curva patrón que se usa para cuantificar el porcentaje de inhibición después del tratamiento de las muestras de ensayo con oligonucleótido antisentido.

Antes del análisis por PCR cuantitativa, se evalúa la capacidad de los conjuntos cebador-sonda específicos para el gen diana que se está midiendo, para "multiplexar" con una reacción de amplificación de GAPDH. En el multiplexado, tanto el gen diana como el gen de referencia interno GAPDH son amplificados simultáneamente en una sola muestra. En este análisis, el ARNm aislado de células no tratadas se diluye de forma seriada. Cada dilución se amplifica en presencia de conjuntos de cebador-sonda específicos solo para GAPDH, solo para el gen diana ("plexado individual"), o para ambos (multiplexado). Después de la amplificación por PCR, se generan las curvas patrón de la señal de ARNm de GAPDH y diana como una función de la dilución, a partir de las muestras tanto de plexado individual como multiplexadas. Si tanto la pendiente como el coeficiente de correlación de las señales de GAPDH y de la diana generados a partir de las muestras multiplexadas están dentro del 10% de sus valores correspondientes generados a partir de muestras de plexado individual, el conjunto de cebador-sonda específico para esa diana se considera que se puede multiplexar. También se conocen otros métodos de PCR en la técnica.

Los reactivos de la PCR se obtuvieron de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo añadiendo 25 µl de cóctel de PCR (1x tampón A TAQMAN™, MgCl₂ 5,5 mM, 300 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, dUTP 600 µM, 100 nM de cada uno del cebador directo, cebador inverso y sonda, 1,25 unidades de AMPLITAQ GOLD™, y 12,5 unidades de transcriptasa inversa MuLV) a placas de 96 pocillos que contenían 25 µl de disolución de ARN total. La reacción en RT se llevó a cabo por incubación durante 30 min a 48°C. Después de una incubación de 10 min a 95°C para activar la AMPLITAQ GOLD™, se llevaron a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR en dos etapas: 95°C durante 15 segundos (desnaturalización) seguido de 60°C durante 1,5 minutos (reasociación/extensión).

Las cantidades del gen diana obtenidas por la RT-PCR en tiempo real se normalizaron usando el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o por cuantificación del ARN total usando RiboGreen™ (Molecular Sondas, Inc. Eugene, OR). La expresión de GAPDH se cuantifica por la RT-PCR en tiempo real, llevándola a cabo simultáneamente con la diana, multiplexado, o por separado. El ARN total se cuantifica usando el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen™ de Molecular Sondas. Los métodos de cuantificación del ARN por RiboGreen™ se enseñan en Jones, L.J., et al, *Analytical Biochemistry*, 1998, 265, 368-374.

En este ensayo, se añaden mediante pipeta 175 µl de reactivo de trabajo RiboGreen™ (reactivo RiboGreen™ diluido 1:2865 en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, a pH 7,5) a una placa de 96 pocillos que contienen 25 µl de ARN celular purificado. La placa se lee en un aparato CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con excitación a 480 nm y emisión a 520 nm.

- 5 Las sondas y cebadores para la apolipoproteína B humana se diseñaron para hibridar con una secuencia de apolipoproteína B humana, usando la información de la secuencia publicada (número de acceso en GenBank NM_000384.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 3). Para la apolipoproteína B humana los cebadores de la PCR eran: cebador directo: TGCTAAAGGCACATATGGCCT (SEQ ID NO: 4) cebador inverso: CTCAGGTTGGACTCTCCATTGAG (SEQ ID NO: 5) y la sonda de la PCR era: FAM-CTTGTCAGAGGGATCCTAACACTGGCCG-TAMRA (SEQ ID NO: 6) donde FAM (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador. Para la GAPDH humana los cebadores de la PCR eran:

cebador directo: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (SEQ ID NO: 7)

- 15 cebador inverso: GAAGATGGTGTATGGGATTTC (SEQ ID NO: 8) y la sonda de la PCR era: 5' JOE-CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC-TAMRA 3' (SEQ ID NO: 9) donde JOE (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador.

- 20 Las sondas y cebadores para la apolipoproteína B de ratón se diseñaron para hibridar con una secuencia de apolipoproteína B de ratón, usando la información de la secuencia publicada (número de acceso en GenBank M35186, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 10). Para la apolipoproteína B de ratón los cebadores de la PCR eran:

cebador directo: CGTGGGCTCCAGCATTCTA (SEQ ID NO: 11)

- 25 cebador inverso: AGTCATTTCTGCCTTTGCGTC (SEQ ID NO: 12) y la sonda de la PCR era: FAM-CCAATGGTCGGGCACTGCTCAA-TAMRA SEQ ID NO: 13) donde FAM (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador.

Para la GAPDH de ratón los cebadores de la PCR eran:

cebador directo: GGCAAATTCACGGCACAGT (SEQ ID NO: 14)

- 30 cebador inverso: GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT (SEQ ID NO: 15) y la sonda de la PCR era: 5' JOE-AAGCCGAGAATGGGAAGCTTGTCATC-TAMRA 3' (SEQ ID NO: 16) donde JOE (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador.

Ejemplo 14

Análisis de transferencia Northern de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B

- 35 Dieciocho horas después del tratamiento antisentido, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron en 1 ml de RNAzol™ (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX). El ARN total se preparó siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. Se fraccionaron 20 microgramos de ARN total por electroforesis por geles de agarosa al 1,2% que contenían 1,1% de formaldehído usando un sistema de tampón MOPS (AMRESCO, Inc. Solon, OH). El ARN se transfirió del gel a las membranas de nailon HYBOND™-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) mediante transferencia capilar durante la noche usando un sistema de tampón de transferencia Northern/Southern (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX). La transferencia de ARN se confirmó por visualización UV. Las membranas se fijaron por reticulación UV usando un reticulador UV STRATALINKER™ UV Crosslinker 2400 (Stratagene, Inc, La Jolla, CA) y después se trataron con la sonda usando disolución de hibridación QUICKHYB™ (Stratagene, La Jolla, CA) usando las recomendaciones del fabricante para condiciones restrictivas.
- 45 Para detectar la apolipoproteína B humana, se preparó una sonda específica de la apolipoproteína B humana por PCR usando el cebador directo TGCTAAAGGCACATATGGCCT (SEQ ID NO: 4) y el cebador inverso CTCAGGTTGGACTCTCCATTGAG (SEQ ID NO: 5). Para normalizar las variaciones en la eficacia de la carga y transferencia, las membranas se cortaron en tiras y se trataron con sondas para el ARN de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) humana (Clontech, Palo Alto, CA).
- 50 Para detectar la apolipoproteína B de ratón, se preparó una sonda específica de apolipoproteína B humana por PCR usando el cebador directo CGTGGGCTCCAGCATTCTA (SEQ ID NO: 11) y el cebador inverso AGTCATTTCTGCCTTTGCGTC (SEQ ID NO: 12). Para normalizar las variaciones en la eficacia de la carga y transferencia, las membranas se cortaron en tiras y se trataron con sondas para el ARN de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de ratón (Clontech, Palo Alto, CA).

Las membranas hibridadas se visualizaron y cuantificaron usando el Software fosfoRIMAGER™ y IMAGEQUANT™ V3.3 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Los datos se normalizaron para los niveles de GAPDH en los controles no tratados.

Ejemplo 15

- 5 Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

Se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando la secuencia publicada (número de acceso en GenBank NM_000384.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 3). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 1. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 1 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos en los que las células HepG2 se trataron con los compuestos de la tabla 1 en concentración 150 nM. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

20 Tabla 1

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
147780	5'UTR	3	1	CCGCAGGTCCCGGTGGAAT	40	17
147781	5'UTR	3	21	ACCGAGAAGGGCACTCAGCC	35	18
147782	5'UTR	3	71	GCCTCGGCCTCGCGCCCTG	67	19
147783	Codón de inicio	3	114	TCCATCGCCAGCTGCGGTGG	N.D.	20
147784	Codificante	3	151	CAGCGCCAGCAGCGCCAGCA	70	21
147785	Codificante	3	181	GCCCGCCAGCAGCAGCAGCA	29	22
147786	Codificante	3	321	CTTGAATCAGCAGTCCCAGG	34	23
147787	Codificante	3	451	CTTCAGCAAGGCTTTGCCCT	N.D.	24
147788	Codificante	3	716	TTTCTGTTGCCACATTGCCC	95	25
147789	Codificante	3	911	GGAAGAGGTGTTGCTCCTTG	24	26
147790	Codificante	3	951	TGTGCTACCATCCCATACTT	33	27
147791	Codificante	3	1041	TCAAATGCGAGGCCCATCTT	N.D.	28
147792	Codificante	3	1231	GGACACCTCAATCAGCTGTG	26	29
147793	Codificante	3	1361	TCAGGGCCACCAGGTAGGTG	N.D.	30

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
147794	Codificante	3	1561	GTAATCTTCATCCCCAGTGC	47	31
147795	Codificante	3	1611	TGCTCCATGGTTTGGCCCAT	N.D.	32
147796	Codificante	3	1791	GCAGCCAGTCGCTTATCTCC	8	33
147797	Codificante	3	2331	GTATAGCCAAAGTGGTCCAC	N.D.	34
147798	Codificante	3	2496	CCCAGGAGCTGGAGGTCATG	N.D.	35
147799	Codificante	3	2573	TTGAGCCCTTCCTGATGACC	N.D.	36
147800	Codificante	3	2811	ATCTGGACCCCACTCCTAGC	N.D.	37
147801	Codificante	3	2842	CAGACCCGACTCGTGGAAGA	38	38
147802	Codificante	3	3367	GCCCTCAGTAGATTCATCAT	N.D.	39
147803	Codificante	3	3611	GCCATGCCACCCTCTTGAA	N.D.	40
147804	Codificante	3	3791	AACCCACGTGCCGAAAGTC	N.D.	41
147805	Codificante	3	3841	ACTCCCAGATGCCTTCTGAA	N.D.	42
147806	Codificante	3	4281	ATGTGGTAACGAGCCCGAAG	100	43
147807	Codificante	3	4391	GGCGTAGAGACCCATCACAT	25	44
147808	Codificante	3	4641	GTGTTAGGATCCCTCTGACA	N.D.	45
147809	Codificante	3	5241	CCCAGTGATAGCTCTGTGAG	60	46
147810	Codificante	3	5355	ATTTCAGCATATGAGCCCAT	0	47
147811	Codificante	3	5691	CCCTGAACCTTAGCAACAGT	N.D.	48
147812	Codificante	3	5742	GCTGAAGCCAGCCCAGCGAT	N.D.	49
147813	Codificante	3	5891	ACAGCTGCCCAGTATGTTCT	N.D.	50
147814	Codificante	3	7087	CCCAATAAGATTTATAACAA	34	51
147815	Codificante	3	7731	TGGCCTACCAGAGACAGGTA	45	52
147816	Codificante	3	7841	TCATACGTTTAGCCCAATCT	100	53
147817	Codificante	3	7901	GCATGGTCCCAAGGATGGTC	0	54

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
147818	Codificante	3	8491	AGTGATGGAAGCTGCGATAC	30	55
147819	Codificante	3	9181	ATGAGCATCATGCCTCCCAG	N.D.	56
147820	Codificante	3	9931	GAACACATAGCCGAATGCCG	100	57
147821	Codificante	3	10263	GTGGTGCCCTCTAATTTGTA	N.D.	58
147822	Codificante	3	10631	CCCGAGAAAGAACCGAACCC	N.D.	59
147823	Codificante	3	10712	TGCCCTGCAGCTTCACTGAA	19	60
147824	Codificante	3	11170	GAAATCCCATAAGCTCTTGT	N.D.	61
147825	Codificante	3	12301	AGAAGCTGCCTCTTCTTCCC	72	62
147826	Codificante	3	12401	TCAGGGTGAGCCCTGTGTGT	80	63
147827	Codificante	3	12471	CTAATGGCCCCTTGATAAAC	13	64
147828	Codificante	3	12621	ACGTTATCCTTGAGTCCCTG	12	65
147829	Codificante	3	12741	TATATCCCAGGTTTCCCCGG	64	66
147830	Codificante	3	12801	ACCTGGGACAGTACCGTCCC	N.D.	67
147831	3'UTR	3	13921	CTGCCTACTGCAAGGCTGGC	0	68
147832	3'UTR	3	13991	AGAGACCTTCCGAGCCCTGG	N.D.	69
147833	3'UTR	3	14101	ATGATACACAATAAAGACTC	25	70

Como se muestra en la tabla 1, las SEQ ID NO 17, 18, 19, 21, 23, 25, 27, 31, 38, 43, 46, 51, 52, 53, 55, 57, 62, 63 y 66 demostraron al menos 30% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B humana en este ensayo y por lo tanto se prefieren. Los sitios diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "sitios activos" y por lo tanto son sitios preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción. Puesto que la apolipoproteína B existe en dos formas en mamíferos (ApoB-48 y ApoB-100) que son colineales en el extremo amino, los oligonucleótidos antisentido que se dirigen a los nucleótidos 1-6530 hibridan con ambas formas, mientras que los que se dirigen a los nucleótidos 6531-14121 son específicos de la forma larga de la apolipoproteína B.

Ejemplo 16

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Estudio de dosis-respuesta

Un subconjunto de oligonucleótidos antisentido del ejemplo 15 se investigaron más en estudios de dosis y respuesta. Las dosis de tratamiento eran 50, 150 y 250 nM. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos y se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi			
Porcentaje de inhibición			
nº de ISIS	50 mM	150 nM	250 nM
147788	54	63	72
147806	23	45	28
147816	25	81	65
147820	10	0	73

Ejemplo 17

5 Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B de ratón por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

10 Se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B de ratón, usando la secuencia publicada (número de acceso en GenBank M35186, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 10). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la

15 tabla 3 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de ratón en hepatocitos primarios de ratón por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los hepatocitos primarios de ratón se trataron con los compuestos 150 mM de la tabla 3. Los datos son medias de dos experimentos. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 3

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de ratón por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
147475	Codificante	10	13	ATTGTATGTGAGAGGTGAGG	79	71
147476	Codificante	10	66	GAGGAGATTGGATCTTAAGG	13	72
147477	Codificante	10	171	CTTCAAATTGGGACTCTCCT	N.D.	73
147478	Codificante	10	211	TCCAGGAATTGAGCTTGTGC	78	74
147479	Codificante	10	238	TTCAGGACTGGAGGATGAGG	N.D.	75
147480	Codificante	10	291	TCTCACCTCATGCTCCATT	54	76
147481	Codificante	10	421	TGACTGTCAAGGGTGAGCTG	24	77

ES 2 420 914 T3

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de ratón por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
147482	Codificante	10	461	GTCCAGCCTAGGAACACTCA	59	78
147483	Codificante	10	531	ATGTCAATGCCACATGTCCA	N.D	79
147484	Codificante	10	581	TTCATCCGAGAAGTTGGGAC	49	80
147485	Codificante	10	601	ATTTGGGACGAATGTATGCC	64	81
147486	Codificante	10	711	AGTTGAGGAAGCCAGATTCA	N.D	82
147487	Codificante	10	964	TTCCCAGTCAGCTTTAGTGG	73	83
147488	Codificante	10	1023	AGCTTGCTTGTTGGGCACGG	72	84
147489	Codificante	10	1111	CCTATACTGGCTTCTATGTT	5	85
147490	Codificante	10	1191	TGAACTCCGTGTAAGGCAAG	N.D	86
147491	Codificante	10	1216	GAGAAATCCTTCAGTAAGGG	71	87
147492	Codificante	10	1323	CAATGGAATGCTTGTCCTG	68	88
147493	Codificante	10	1441	GCTTCATTATAGGAGGTGGT	41	89
147494	Codificante	10	1531	ACAACTGGGATAGTGTAGCC	84	90
147495	Codificante	10	1631	GTTAGGACCAGGGATTGTGA	0	91
147496	Codificante	10	1691	ACCATGGAAACTGGCAACT	19	92
147497	Codificante	10	1721	TGGGAGGAAAACTTGAATA	N.D	93
147498	Codificante	10	1861	TGGGCAACGATATCTGATTG	0	94
147499	Codificante	10	1901	CTGCAGGGCGTCAGTGACAA	29	95
147500	Codificante	10	1932	GCATCAGACGTGATGTTCCC	N.D	96
147501	Codificante	10	2021	CTTGTTAACTAATGGTGC	18	97
147502	Codificante	10	2071	ATGGGAGCATGGAGTTGGC	16	98
147503	Codificante	10	2141	AATGGATGATGAAACAGTGG	26	99
147504	Codificante	10	2201	ATCAATGCCTCCTGTTGCAG	N.D	100
147505	Codificante	10	2231	GGAAGTGAGACTTTCTAAGC	76	101

ES 2 420 914 T3

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de ratón por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
147506	Codificante	10	2.281	AGGAAGGAACTCTTGATATT	58	102
147507	Codificante	10	2321	ATTGGCTTCATTGGCAACAC	81	103
147759	Codificante	10	1	AGGTGAGGAAGTTGGAATTC	19	104
147760	Codificante	10	121	TTGTTCCCTGAAGTTGTTAC	N.D	105
147761	Codificante	10	251	GTTTCATGGATTCCCTTCAGGA	45	106
147762	Codificante	10	281	ATGCTCCATTCTCACATGCT	46	107
147763	Codificante	10	338	TGCGACTGTGTCTGATTTCC	34	108
147764	Codificante	10	541	GTCCCTGAAGATGTCAATGC	97	109
147765	Codificante	10	561	AGGCCAGTTCATGACCCT	59	110
147766	Codificante	10	761	GGAGCCCACGTGCTGAGATT	59	111
147767	Codificante	10	801	CGTCCTTGAGCAGTGCCCGA	5	112
147768	Codificante	10	1224	CCCATATGGAGAAATCCTTC	24	113
147769	Codificante	10	1581	CATGCCTGGAAGCCAGTGTC	89	114
147770	Codificante	10	1.741	GTGTTGAATCCCTTGAAATC	67	115
147771	Codificante	10	1781	GGTAAAGTTGCCCATGGCTG	68	116
147772	Codificante	10	1841	GTTATAAAGTCCAGCATTGG	78	117
147773	Codificante	10	1931	CATCAGACGTGATGTTCCCT	85	118
147774	Codificante	10	1956	TGGCTAGTTTCAATCCCCTT	84	119
147775	Codificante	10	2002	CTGTCATGACTGCCCTTTAC	52	120
147776	Codificante	10	2091	GCTTGAAGTTCATTGAGAAT	92	121
147777	Codificante	10	2291	TTCCTGAGAAAGGAAGGAAC	N.D	122
147778	Codificante	10	2331	TCAGATATACATTGGCTTCA	14	123

Como se muestra en la tabla 3, las SEQ ID No 71, 74, 76, 78, 81, 83, 84, 87, 88, 90, 101, 102, 103, 109, 111, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 y 121 demostraron al menos 50% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B de ratón en este ensayo y por lo tanto son preferidas. Los sitios diana de los que estas secuencias

preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "sitios activos" y por lo tanto son sitios preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción.

Ejemplo 18

5 Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B de ratón por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Estudio de dosis-respuesta

10 Un subconjunto de oligonucleótidos antisentido del ejemplo 17 se investigaron más en estudios de dosis y respuesta. Las dosis de tratamiento eran 50, 150 y 300 nM. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de ratón en células hepatocitos primarios por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos y se muestran en la tabla 4.

Tabla 4

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de ratón por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi			
	Porcentaje de inhibición		
nº de ISIS	50 nM	150 nM	300 nM
147483	56	88	89
147764	48	84	90
147769	3	14	28
147776	0	17	44

Ejemplo 19

Análisis de transferencia Western de los niveles de la proteína apolipoproteína B

15 Se llevaron a cabo análisis de transferencia Western (análisis de inmunotransferencia) usando métodos convencionales. Las células se recogieron 16-20 h después del tratamiento con oligonucleótido, se lavaron una vez con PBS, se suspendieron en tampón de Laemmli (100 ul/pocillo), se hirvieron durante 5 min y se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 16%. Los geles se hicieron correr durante 1,5 h a 150 V, y se transfirieron a membrana para la transferencia Western. Se usó el anticuerpo primario adecuado dirigido contra la apolipoproteína B, con un anticuerpo secundario radiomarcado o con marcaje fluorescente dirigido contra el anticuerpo primario. Las bandas se visualizaron usando fosfoRIMAGER™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA) o el sistema de detección de quimioluminiscente ECL+ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

Ejemplo 20

25 Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en ratones C57BL/6: Animales magros frente a animales alimentados con dieta alta en grasa.

Se usaron ratones C57BL/6, una cepa que se ha descrito que es susceptible a la formación de placas ateroscleróticas inducidas por hiperlipidemia, en los siguientes estudios para evaluar los oligonucleótidos antisentido como potenciales compuestos reductores de lípidos en ratones magros frente a alimentados con dieta alta en grasa.

30 Los ratones C57BL/6 macho se dividieron en dos grupos; (1) animales de control no manipulados genéticamente (animales magros) y (2) animales que recibían una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa). Los animales de control recibieron tratamiento salino y se mantuvieron con una dieta normal para roedores. Después de ayunar durante la noche, se administró a los ratones de cada grupo por vía intraperitoneal cada 3 días, disolución salina o ISIS 147764 50 mg/kg (SEQ ID No: 109) durante 6 semanas. Al terminar el estudio y 48 h después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de ARNm diana en el hígado, niveles de colesterol y triglicéridos, niveles de enzimas hepáticas y niveles de glucosa en el suero.

Los resultados de los estudios comparativos se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Efectos del tratamiento con ISIS 147764 en los niveles de ARNm de apolipoproteína B, colesterol, lípidos, triglicéridos, enzimas hepáticas y glucosa, en ratones magros y con dieta alta en grasa.									
Grupo de tratamiento	Porcentaje de cambio								
	Lipoproteínas					Enzimas hepáticas			
	ARNm	COL.	VLDL	LDL	HDL	TRIG.	AST	ALT	GLUC.
Control magros	-73	-63	no hay cambios	-64	-44	-34	ligera disminución	no hay cambios	no hay cambios
Grupo de dieta alta en grasa	-87	-67	no hay cambios	-87	-65	no hay cambios	ligera disminución	ligero aumento	-28

Es evidente a partir de estos datos, que el tratamiento con ISIS 147764 disminuyó el colesterol así como las lipoproteínas LDL y HDL y la glucosa en el suero tanto en ratones magros como en los de dieta alta en grasa, y que los efectos demostrados se deben, de hecho, a la inhibición de la expresión de la apolipoproteína B como apoya la disminución de los niveles de ARNm. No se observaron cambios significativos en los niveles de enzimas hepáticas, lo que indica que el oligonucleótido antisentido no era tóxico para ninguno de los grupos de tratamiento.

Ejemplo 21

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en ratones alimentados con dieta alta en grasa; Estudio de la evolución temporal de 6 semanas

Se llevó a cabo un estudio de la evolución temporal de 6 semanas para investigar más los efectos de ISIS 147764 en el metabolismo de lípidos y glucosa en ratones alimentados con dieta alta en grasa.

Se evaluó en ratones C57BL/6 macho (n=8) que recibían una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa) a lo largo de un periodo de 6 semanas, los efectos del tratamiento con el oligonucleótido antisentido, ISIS 147764. Los animales de control recibieron tratamiento con disolución salina (50 mg/kg). Un subconjunto de animales recibió una dosis oral diaria (20 mg/kg) de atorvastatina de calcio (Lipitor®, Pfizer Inc.). Se administró a todos los ratones, excepto los animales tratados con atorvastatina, por vía intraperitoneal cada 3 días (dos veces por semana), después de la noche en ayunas, 5, 25, 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) o disolución salina (50 mg/kg) durante 6 semanas. Se analizó el colesterol y las lipoproteínas en el suero en los tiempos de medición intermedios de 0, 2 y 6 semanas. Al terminar el estudio, los animales se sacrificaron 48 h después de las inyecciones finales y se evaluaron los niveles de ARNm diana en el hígado, niveles de colesterol, lipoproteína, triglicéridos, enzimas hepáticas (AST y ALT) y glucosa en el suero, así como los pesos corporal, del hígado, bazo y almohadillas de grasa.

Ejemplo 22

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en ratones alimentados con dieta alta en grasa - expresión de ARNm en el hígado

Se evaluó en ratones C57BL/6 macho (n=8) que recibían una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa) a lo largo de un periodo de 6 semanas, los efectos de ISIS 147764 en la expresión de ARNm. Los animales de control recibieron tratamiento con disolución salina (50 mg/kg). Se administró a los ratones por vía intraperitoneal cada 3 días (dos veces por semana) 5, 25, 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) o disolución salina (50 mg/kg) durante 6 semanas. Al terminar el estudio, los animales se sacrificaron 48 h después de las inyecciones finales y se evaluaron los niveles de ARNm diana en el hígado. ISIS 147764 mostró un efecto de dosis-respuesta, reduciendo los niveles de ARNm en 15, 75 y 88% con dosis de 5, 25 y 50 mg/kg, respectivamente.

Las muestras de proteínas hepáticas recogidas al final del periodo de tratamiento se sometieron a análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo dirigido contra la proteínas apolipoproteína B de ratón (Gladstone Institute, San Francisco, CA). Estos datos demuestran que el tratamiento con ISIS 147764 disminuye la expresión de la proteína apolipoproteína B en el hígado, de una forma dependiente de la dosis, además de reducir los niveles de ARNm.

Ejemplo 23

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en los niveles de colesterol y triglicéridos en el suero

5 Se evaluó en ratones C57BL/6 macho (n=8) que recibían una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa) a lo largo de un periodo de 6 semanas, los efectos de ISIS 147764 en los niveles de colesterol y triglicéridos en el suero. Los animales de control recibieron tratamiento con disolución salina (50 mg/kg). Se administró a los ratones por vía intraperitoneal cada 3 días (dos veces por semana) 5, 25, 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) o disolución salina (50 mg/kg) durante 6 semanas.

10 Los niveles de colesterol en el suero se midieron a las 0, 2 y 6 semanas y estos datos se muestran en la tabla 6. Los valores en la tabla se expresan como porcentaje de inhibición y están normalizados respecto al control de disolución salina.

Además del colesterol del suero, al final del estudio, los animales se sacrificaron 48 h después de las inyecciones finales y se evaluaron los niveles de triglicéridos.

15 Los ratones tratados con ISIS 147764 mostraron una reducción tanto del colesterol en el suero (240 mg/dl para los animales de control y 225, 125 y 110 mg/dl para dosis de 5, 25 y 50 mg/kg, respectivamente) como de los triglicéridos (115 mg/dl para animales de control y 125, 150 y 85 mg/dl para dosis de 5, 25 y 50 mg/kg, respectivamente) con respecto a los niveles normales al final de estudio. Estos datos también se compararon con los efectos de la atorvastatina de calcio con una dosis oral de 20 mg/kg, que mostró solo una mínima disminución del colesterol en el suero del 20% al terminar el estudio.

20 Tabla 6

Porcentaje de inhibición de la apolipoproteína B en los niveles de colesterol por ISIS 147764				
	Porcentaje de inhibición			
tiempo	Disolución salina	5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
0 semanas	0	0	0	0
2 semanas	0	5	12	20
6 semanas	0	10	45	55

Ejemplo 24

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en los niveles de lipoproteína

25 Se evaluó en ratones C57BL/6 macho (n=8) que recibían una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa) a lo largo de un periodo de 6 semanas, los efectos de ISIS 147764 en los niveles de lipoproteínas (VLDL, LDL y HDL). Los animales de control recibieron tratamiento con disolución salina (50 mg/kg). Se administró a los ratones por vía intraperitoneal cada 3 días (dos veces por semana) 5, 25, 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) o disolución salina (50 mg/kg) durante 6 semanas.

30 Los niveles de lipoproteínas se midieron a las 0, 2 y 6 semanas y estos datos se muestran en la tabla 7. Los valores en la tabla se expresan como porcentaje de inhibición y están normalizados respecto al control de disolución salina. Los valores negativos indican un aumento observado en los niveles de lipoproteínas.

Estos datos también se compararon con los efectos de la atorvastatina de calcio con una dosis oral diaria de 20 mg/kg a las 0, 2 y 6 semanas.

35 Estos datos demuestran que con una dosis de 50 mg/kg, ISIS 147764 es capaz de reducir todas las categorías de lipoproteínas en el suero investigadas en una mayor extensión que la atorvastatina.

Tabla 7

Porcentaje de inhibición de la apolipoproteína B de ratón por ISIS 147764 en los niveles de lipoproteínas comparado con la atorvastatina						
		Porcentaje de inhibición				
		Dosis				
Lipoproteína	Tiempo (semanas)	Disolución salina	5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	atorvastatina (20 mg/kg)
VLDL	0	0	0	0	0	0
	2	0	25	30	40	15
	6	0	10	-30	15	-5
LDL	0	0	0	0	0	0
	2	0	-30	10	40	10
	6	0	-10	55	90	-10
HDL	0	0	0	0	0	0
	2	0	5	10	10	15
	6	0	10	45	50	20

Ejemplo 25

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en los niveles de AST y ALT en el suero

- 5 Se evaluó en ratones C57BL/6 macho (n=8) que recibían una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa) a lo largo de un periodo de 6 semanas, los efectos de ISIS 147764 en los niveles de enzimas hepáticas (AST y ALT). Los mayores niveles de las enzimas hepáticas ALT y AST indican toxicidad y daño hepático. Los animales de control recibieron tratamiento con disolución salina (50 mg/kg). Se administró a los ratones por vía intraperitoneal cada 3 días (dos veces por semana) 5, 25, 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) o disolución salina (50 mg/kg) durante 6 semanas. Los niveles de AST y ALT se midieron a las 6 semanas.

Los ratones tratados con ISIS 147764 no mostraron un cambio significativo en los niveles de AST a lo largo de la duración del estudio comparado con los controles de disolución salina (105, 70 y 80 UI/l para dosis de 5, 25 y 50 mg/kg, respectivamente, comparado con 65 UI/l para el control con disolución salina). Los ratones tratados con atorvastatina con una dosis oral diaria de 20 mg/kg tenían niveles de AST de 85 UI/l.

- 15 Los niveles de ALT aumentaron con todos los tratamientos con ISIS 147764 a lo largo de la duración del estudio comparado con los controles de disolución salina (50, 70 y 100 UI/l para dosis de 5, 25 y 50 mg/kg, respectivamente, comparado con 25 UI/l para controles de disolución salina). Los ratones tratados con atorvastatina con una dosis oral diaria de 20 mg/kg tenían niveles de AST de 40 UI/l.

Ejemplo 26

- 20 Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en los niveles de glucosa en el suero

Se evaluó en ratones C57BL/6 macho (n=8) que recibían una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa) a lo largo de un periodo de 6 semanas, los efectos de ISIS 147764 en los niveles de glucosa en el suero. Los animales de control recibieron tratamiento con disolución salina (50 mg/kg). Se administró a los ratones por vía intraperitoneal cada 3 días (dos veces por semana) 5, 25, 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) o disolución salina (50 mg/kg) durante 6 semanas.

25

Al terminar el estudio, los animales se sacrificaron 48 h después de las inyecciones finales y se evaluaron los niveles de glucosa en el suero. ISIS 147764 mostró un efecto de dosis-respuesta, reduciendo los niveles de glucosa en el suero a 225, 190 y 180 mg/dl con dosis de 5, 25 y 50 mg/kg, respectivamente, comparado con el control de disolución salina de 300 mg/dl. Los ratones tratados con atorvastatina con una dosis oral diaria de 20 mg/kg tenían niveles de glucosa en el suero de 215 mg/dl. Estos datos demuestran que ISIS 147764 es capaz de reducir los niveles de glucosa en el suero en ratones alimentados con dieta alta en grasa.

Ejemplo 27

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en el peso corporal, de bazo, hígado y almohadillas de grasa

Se evaluó en ratones C57BL/6 macho (n=8) que recibían una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa) a lo largo de un periodo de 6 semanas, los efectos de ISIS 147764 en el peso corporal, de bazo, hígado y almohadillas de grasa. Los animales de control recibieron tratamiento con disolución salina (50 mg/kg). Se administró a los ratones por vía intraperitoneal cada 3 días (dos veces por semana) 5, 25, 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) o disolución salina (50 mg/kg) durante 6 semanas.

Al terminar el estudio, los animales se sacrificaron 48 h después de las inyecciones finales y se midieron los pesos corporal, de bazo, hígado y almohadillas de grasa. Estos datos se muestran en la tabla 8. Los valores se expresan como porcentaje de cambio en el peso corporal o peso del órgano comparado con los animales de control tratados con disolución salina. Los datos de los ratones tratados con atorvastatina con una dosis diaria de 20 mg/kg también se muestran en la tabla. Los valores negativos indicaban una disminución del peso.

Tabla 8

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B de ratón en el peso corporal y de órganos				
	Porcentaje de cambio			
	Dosis			Atorvastatina 20 mg/kg
Tejido	5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	
Peso corporal total	5	5	-4	1
Bazo	10	10	46	10
Hígado	18	70	80	15
Grasa	10	6	-47	7

Estos datos muestran una disminución en la grasa a lo largo del intervalo de dosificación de ISIS 147764 contrarrestado por un aumento tanto del peso del bazo como del hígado con una dosis mayor para dar una disminución general del peso corporal total.

Ejemplo 28

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en ratones que no expresan B6.129P-ApoE^{tm1Unc}: Animales magros frente a animales alimentados con dieta alta en grasa.

Los ratones que no expresan B6.129P-ApoE^{tm1Unc} (denominados en la presente memoria ratones que no expresan ApoE) obtenidos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), son homocigóticos para la mutación ApoE^{tm1Unc} y muestran un aumento notable de los niveles totales de colesterol en el plasma que no son afectados por la edad o el sexo. Estos animales presentan estrías grasas en la aorta proximal a la edad de 3 meses. Estas lesiones aumentan con la edad y evolucionan a lesiones con menos lípidos pero células más alargadas, típico de un estadio más avanzado de la lesión preaterosclerótica.

La mutación en estos ratones reside en el gen de la apolipoproteína E (ApoE). La función principal de la proteína ApoE es transportar el colesterol y los triglicéridos por todo el cuerpo. Estabiliza la estructura de las lipoproteínas, se une al receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) y proteínas relacionadas, y está presente en una subclase de HDL, proporcionándoles la capacidad para unirse al LDLR. La ApoE es expresada de forma más abundante en el hígado y el cerebro. Se usaron ratones hembra que no expresan B6.129P-ApoE^{tm1Unc} (ratones que no expresan

ApoE) en los siguientes estudios para evaluar los oligonucleótidos antisentido como potenciales compuestos que reducen los lípidos.

- 5 Los ratones hembra que no expresan ApoE tenían edades comprendidas entre 5 y 7 semanas y se pusieron en una dieta normal durante 2 semanas antes de iniciar el estudio. Después, los ratones que no expresan ApoE se alimentaron a voluntad con una dieta con 60% de grasa, con 0,15% de colesterol añadido para inducir dislipidemia y obesidad. Los animales de control se mantuvieron con una dieta alta en grasa sin colesterol añadido. Después de ayunar durante la noche, se administró a los ratones de cada grupo por vía intraperitoneal cada 3 días, disolución salina, 50 mg/kg de un oligonucleótido antisentido de control (ISIS 29837; TCGATCTCCTTTTATGCCCG; SEQ. ID. NO. 124) o 5, 25 ó 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) durante 6 semanas.
- 10 El oligonucleótido de control es un oligonucleótido quimérico ("gámpmeros") de 20 nucleótidos de longitud, compuesto de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.
- 15 Al terminar el estudio y 48 h después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de ARNm diana en el hígado por métodos de RT-PCR verificado por análisis de transferencia Northern, los niveles de glucosa, niveles de colesterol y lípidos por métodos de separación de HPLC y niveles de triglicéridos y enzimas hepáticas (realizados por LabCorp Preclinical Services; San Diego, CA). Los datos de los ratones que no expresan ApoE tratados con atorvastatina con una dosis diaria de 20 mg/kg, también se muestran en la tabla para
- 20 comparar.

Los resultados de los estudios comparativos se muestran en la tabla 9. Los datos están normalizados respecto a controles de disolución salina.

Tabla 9

Efectos del tratamiento con ISIS 147764 en los niveles de ARNm de apolipoproteína B, colesterol, glucosa, lípidos, triglicéridos y enzimas hepáticas, en ratones que no expresan ApoE.						
		Porcentaje de inhibición				
		Dosis				
		Control	5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	atorvastatina (20 mg/kg)
ARNm		0	2	42	70	10
Glucosa		Niveles de glucosa (mg/dl)				
		225	195	209	191	162
		Niveles de colesterol (mg/dl)				
Colesterol		1750	1630	1750	1490	938
		Niveles de lipoproteínas (mg/dl)				
Lipoproteína	HDL	511	49	62	61	42
	LDL	525	475	500	325	250
	VLDL	1190	1111	1194	1113	653

Efectos del tratamiento con ISIS 147764 en los niveles de ARNm de apolipoproteína B, colesterol, glucosa, lípidos, triglicéridos y enzimas hepáticas, en ratones que no expresan ApoE.						
		Porcentaje de inhibición				
		Dosis				
		Control	5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	atorvastatina (20 mg/kg)
		Niveles de enzimas hepáticas (UI/l)				
Enzimas hepáticas	AST	55	50	60	85	75
	ALT	56	48	59	87	76

Es evidente a partir de estos datos que el tratamiento con ISIS 147764 disminuía la glucosa y el colesterol así como todas las lipoproteínas investigadas (HDL, LDL y VLDL) en los ratones que no expresan ApoE. Además, estas disminuciones se correlacionan con una disminución en los niveles tanto de proteína como de ARN de apolipoproteína B, demostrando un mecanismo de acción de tipo antisentido. No se observaron cambios significativos en los niveles de enzimas hepáticas, lo que indica que el oligonucleótido antisentido no era tóxico para ninguno de los grupos de tratamiento.

Ejemplo 29

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi: Oligonucleótidos adicionales

Se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando la secuencia publicada (número de acceso en GenBank NM_000384.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 3). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 10. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 10 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos en los que las células HepG2 se trataron con los compuestos de la tabla 10 en concentración 150 nM. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 10

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
270985	5'UTR	3	199	TTCCTCTTCGGCCCTGGCGC	75	124
270986	codificante	3	299	CTCCACTGGAACCTCTCAGCC	0	125
270987	unión exón: exón	3	359	CCTCCAGCTCAACCTTGACG	0	126

ES 2 420 914 T3

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
270988	codificante	3	429	GGGTTGAAGCCATACACCTC	6	127
270989	unión exón: exón	3	509	CCAGCTTGAGCTCATACCTG	64	128
270990	codificante	3	584	CCCTCTTGATGTTTCAGGATG	42	129
270991	codificante	3	669	GAGCAGTTTCCATACACGGT	21	130
270992	codificante	3	699	CCCTTCCTCGTCTTGACGGT	8	131
270993	codificante	3	756	TTGAAGCGATCACACTGCCC	69	132
270994	codificante	3	799	GCCTTTGATGAGAGCAAGTG	51	133
270995	codificante	3	869	TCCTCTTAGCGTCCAGTGTG	40	134
270996	codificante	3	1179	CCTCTCAGCTCAGTAACCAG	0	135
270997	codificante	3	1279	GCACTGAGGCTGTCCACACT	24	136
270998	codificante	3	1419	CGCTGATCCCTCGCCATGTT	1	137
270999	codificante	3	1459	GTTGACCGCGTGGCTCAGCG	76	138
271000	codificante	3	1499	GCAGCTCCTGGGTCCCTGTA	22	139
271001	codificante	3	1859	CCCATGGTAGAATTTGGACA	53	140
271002	unión exón: exón	3	2179	AATCTCGATGAGGTCAGCTG	48	141
271003	codificante	3	2299	GACACCATCAGGAACTTGAC	46	142
271004	codificante	3	2459	GCTCCTCTCCCAAGATGCGG	10	143
271005	codificante	3	2518	GGCACCCATCAGAAGCAGCT	32	144
271006	codificante	3	2789	AGTCCGGAATGATGATGCCC	42	145
271007	codificante	3	2919	CTGAGCAGCTTGACTGGTCT	26	146
271008	codificante	3	3100	CCCGGTCAGCGGATAGTAGG	37	147
271010	unión exón: exón	3	3449	TGTCACAACCTTAGGTGGCCC	57	148
271011	codificante	3	3919	GTCTGGCAATCCCATGTTCT	51	149

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
271012	codificante	3	4089	CCCACAGACTTGAAGTGGAG	55	150
271013	codificante	3	4579	GAAGTGCCCATCAATCTTGA	19	151
271014	codificante	3	5146	CCCAGAGAGGCCAAGCTCTG	54	152
271015	codificante	3	5189	TGTGTTCCCTGAAGCGGCCA	43	153
271016	codificante	3	5269	ACCCAGAATCATGGCCTGAT	19	154
271017	codificante	3	6049	GGTGCCTGTCTGCTCAGCTG	30	155
271018	codificante	3	6520	ATGTGAAACTTGTCTCTCCC	44	156
271019	codificante	3	6639	TATGTCTGCAGTTGAGATAG	15	157
271020	codificante	3	6859	TTGAATCCAGGATGCAGTAC	35	158
271021	codificante	3	7459	GAGTCTCTGAGTCACCTCAC	38	159
271022	codificante	3	7819	GATAGAATATTGCTCTGCAA	100	160
271023	codificante	3	7861	CCCTTGCTCTACCAATGCTT	44	161
271025	codificante	3	8449	TCCATTCCCTATGTCAGCAT	16	162
271026	codificante	3	8589	GACTCCTTCAGAGCCAGCGG	39	163
271027	codificante	3	8629	CCCATGCTCCGTTCTCAGGT	26	164
271028	codificante	3	8829	CGCAGGTCAGCCTGACTAGA	98	165
271030	codificante	3	9119	CAGTTAGAACACTGTGGCCC	52	166
271031	codificante	3	10159	CAGTGTGATGACACTTGATT	49	167
271032	codificante	3	10301	CTGTGGCTAACTTCAATCCC	22	168
271033	codificante	3	10349	CAGTACTGTTATGACTACCC	34	169
271034	codificante	3	10699	CACTGAAGACCGTGTGCTCT	35	170
271035	codificante	3	10811	TCGTACTGTGCTCCCAGAGG	23	171
271036	codificante	3	10839	AAGAGGCCCTCTAGCTGTAA	95	172
271037	codificante	3	11039	AAGACCCAGAATGAATCCGG	23	173

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
271038	codificante	3	11779	GTCTACCTCAAAGCGTGCAG	29	174
271039	codificante	3	11939	TAGAGGCTAACGTACCATCT	4	175
271041	codificante	3	12149	CCATATCCATGCCCACGGTG	37	176
271042	codificante	3	12265	AGTTTCCTCATCAGATTCCC	57	177
271043	codificante	3	12380	CCCAGTGGTACTTGTTGACA	68	178
271044	codificante	3	12526	CCCAGTGGTGCCACTGGCTG	22	179
271045	codificante	3	12579	GTCAACAGTTCCTGGTACAG	19	180
271046	codificante	3	12749	CCCTAGTGTATATCCCAGGT	61	181
271048	codificante	3	13009	CTGAAGATTACGTAGCACCT	7	182
271049	codificante	3	13299	GTCCAGCCAACCTATACTTGG	54	183
271050	codificante	3	13779	CCTGGAGCAAGCTTCATGTA	42	184
281586	unión exón:exón	3	229	TGGACAGACCAGGCTGACAT	80	185
281587	codificante	3	269	ATGTGTACTTCCGGAGGTGC	77	186
281588	codificante	3	389	TCTTCAGGATGAAGCTGCAG	80	187
281589	codificante	3	449	TCAGCAAGGCTTTGCCCTCA	90	188
281590	codificante	3	529	CTGCTTCCCTTCTGGAATGG	84	189
281591	codificante	3	709	TGCCACATTGCCCTTCCTCG	90	190
281592	codificante	3	829	GCTGATCAGAGTTGACAAGG	56	191
281593	codificante	3	849	TACTGACAGGACTGGCTGCT	93	192
281594	codificante	3	889	GATGGCTTCTGCCACATGCT	74	193
281595	codificante	3	1059	GATGTGGATTTGGTGCTCTC	76	194
281596	codificante	3	1199	TGACTGCTTCATCACTGAGG	77	195
281597	codificante	3	1349	GGTAGGTGACCACATCTATC	36	196
281598	codificante	3	1390	TCGCAGCTGCTGTGCTGAGG	70	197

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
281599	unión exón: exón	3	1589	TTCCAATGACCCGCAGAATC	74	198
281600	codificante	3	1678	GATCATCAGTGATGGCTTTG	52	199
281601	codificante	3	1699	AGCCTGGATGGCAGCTTTCT	83	200
281602	codificante	3	1749	GTCTGAAGAAGAACCTCCTG	84	201
281603	codificante	3	1829	TATCTGCCTGTGAAGGACTC	82	202
281604	codificante	3	1919	CTGAGTTCAAGATATTGGCA	78	203
281605	unión exón: exón	3	2189	CTTCCAAGCCAATCTCGATG	82	204
281606	codificante	3	2649	TGCAACTGTAATCCAGCTCC	86	205
281607	unión exón: exón	3	2729	CCAGTTCAGCCTGCATGTTG	84	206
281608	codificante	3	2949	GTAGAGACCAAATGTAATGT	62	207
281609	codificante	3	3059	CGTTGGAGTAAGCGCCTGAG	70	208
281610	unión exón: exón	3	3118	CAGCTCTAATCTGGTGTCCC	69	209
281611	codificante	3	3189	CTGTCCTCTCTCTGGAGCTC	93	210
281612	codificante	3	3289	CAAGGTCATACTCTGCCGAT	83	211
281613	codificante	3	3488	GTATGGAAATAACACCCTTG	70	212
281614	codificante	3	3579	TAAGCTGTAGCAGATGAGTC	63	213
281615	codificante	3	4039	TAGATCTCTGGAGGATTTGC	81	214
281616	codificante	3	4180	GTCTAGAACACCCAGGAGAG	66	215
281617	codificante	3	4299	ACCACAGAGTCAGCCTTCAT	89	216
281618	codificante	3	4511	AAGCAGACATCTGTGGTCCC	90	217
281619	codificante	3	4660	CTCTCCATTGAGCCGCCAG	96	218
281620	codificante	3	4919	CCTGATATTCAGAACGCAGC	89	219
281621	codificante	3	5009	CAGTGCCTAAGATGTCAGCA	53	220

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
281622	codificante	3	5109	AGCACCAGGAGACTACACTT	88	221
281623	codificante	3	5212	CCCATCCAGACTGAATTTTG	59	222
281624	codificante	3	5562	GGTTCTAGCCGTAGTTTCCC	75	223
281625	codificante	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	94	224
281626	codificante	3	5839	ATGTGCATCGATGGTCATGG	88	225
281627	codificante	3	5869	CCAGAGAGCGAGTTTCCCAT	82	226
281628	codificante	3	5979	CTAGACACGAGATGATGACT	81	227
281629	codificante	3	6099	TCCAAGTCCTGGCTGTATTC	83	228
281630	codificante	3	6144	CGTCCAGTAAGCTCCACGCC	82	229
281631	codificante	3	6249	TCAACGGCATCTCTCATCTC	88	230
281632	codificante	3	6759	TGATAGTGCTCATCAAGACT	75	231
281633	codificante	3	6889	GATTCTGATTTGGTACTTAG	73	232
281634	codificante	3	7149	CTCTCGATTAACATCATGGAC	81	233
281635	codificante	3	7549	ATACACTGCAACTGTGGCCT	89	234
281636	codificante	3	7779	GCAAGAGTCCACCAATCAGA	68	235
281637	codificante	3	7929	AGAGCCTGAAGACTGACTTC	74	236
281638	codificante	3	8929	TCCCTCATCTGAGAATCTGG	66	237
281640	codificante	3	10240	CAGTGCATCAATGACAGATG	87	238
281641	codificante	3	10619	CCGAACCCCTTGACATCTCCT	72	239
281642	codificante	3	10659	GCCTCACTAGCAATAGTTCC	59	240
281643	codificante	3	10899	GACATTTGCCATGGAGAGAG	61	241
281644	codificante	3	11209	CTGTCTCCTACCAATGCTGG	26	242
281645	unión exón: exón	3	11979	TCTGCACTGAAGTCACGGTG	78	243
281646	codificante	3	12249	TCCCGGACCCTCAACTCAGT	76	244

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
281648	3'UTR	3	13958	GCAGGTCCAGTTCATATGTG	81	245
281649	3'UTR	3	14008	GCCATCCTTCTGAGTTCAGA	76	246
301012	unión exón: exón	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	87	247
301013	5'UTR	3	3	CCCCGCAGGTCCCGGTGGGA	82	248
301014	5'UTR	3	6	CAGCCCCGCAGGTCCCGGTG	88	249
301015	5'UTR	3	23	CAACCGAGAAGGGCACTCAG	53	250
301016	5'UTR	3	35	CCTCAGCGGCAGCAACCGAG	62	251
301017	5'UTR	3	36	TCCTCAGCGGCAGCAACCGA	47	252
301018	5'UTR	3	37	CTCCTCAGCGGCAGCAACCG	45	253
301019	5'UTR	3	39	GGCTCCTCAGCGGCAGCAAC	70	254
301020	5'UTR	3	43	GGCGGGCTCCTCAGCGGCAG	85	255
301021	5'UTR	3	116	GTCCATCGCCAGCTGCGGT	89	256
301022	Codón de inicio	3	120	GGCGGGTCCATCGCCAGCTG	69	257
301023	Codón de parada	3	13800	TAGAGGATGATAGTAAGTTC	69	258
301024	3'UTR	3	13824	AAATGAAGATTTCTTTTAAA	5	259
301025	3'UTR	3	13854	TATGTGAAAGTTCAATTGGA	76	260
301026	3'UTR	3	13882	ATATAGGCAGTTTGAATTTT	57	261
301027	3'UTR	3	13903	GCTCACTGTATGGTTTATC	89	262
301028	3'UTR	3	13904	GGCTCACTGTATGGTTTAT	93	263
301029	3'UTR	3	13908	GGCTGGCTCACTGTATGGTT	90	264
301030	3'UTR	3	13909	AGGCTGGCTCACTGTATGGT	90	265
301031	3'UTR	3	13910	AAGGCTGGCTCACTGTATGG	90	266
301032	3'UTR	3	13917	CTACTGCAAGGCTGGCTCAC	63	267

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
301033	3'UTR	3	13922	ACTGCCTACTGCAAGGCTGG	77	268
301034	3'UTR	3	13934	TGCTTATAGTCTACTGCCTA	88	269
301035	3'UTR	3	13937	TTCTGCTTATAGTCTACTGC	82	270
301036	3'UTR	3	13964	TTTGGTGCAGGTCCAGTTCA	88	271
301037	3'UTR	3	13968	CAGCTTTGGTGCAGGTCCAG	90	272
301038	3'UTR	3	13970	GCCAGCTTTGGTGCAGGTCC	86	273
301039	3'UTR	3	13974	TGGTGCCAGCTTTGGTGCAG	73	274
301040	3'UTR	3	13978	GCCCTGGTGCCAGCTTTGGT	74	275
301041	3'UTR	3	13997	GAGTTCAGAGACCTTCCGAG	85	276
301042	3'UTR	3	14012	AAATGCCATCCTTCTGAGTT	81	277
301043	3'UTR	3	14014	AAAAATGCCATCCTTCTGAG	81	278
301044	3'UTR	3	14049	AAAATAACTCAGATCCTGAT	76	279
301045	3'UTR	3	14052	AGCAAAATAACTCAGATCCT	90	280
301046	3'UTR	3	14057	AGTTTAGCAAAATAACTCAG	80	281
301047	3'UTR	3	14064	TCCCCCAAGTTTAGCAAAAT	56	282
301048	3'UTR	3	14071	TTCCTCCTCCCCAAGTTTA	67	283
301217	3'UTR	3	14087	AGACTCCATTTATTTGTTCC	81	284

Ejemplo 30

Inhibición antisentido de la apolipoproteína B - Desplazamiento sobre gen

- Se llevó a cabo un "desplazamiento sobre gen" en el que se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a las regiones del ARN de la apolipoproteína B humana (número de acceso en GenBank NM_000384.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 3) que están cerca del sitio diana de las SEQ ID No 224 o 247. Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 11. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 11 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Las dosis de tratamiento eran 50 nM y 150 nM y están indicadas en la tabla 11. Los datos son medias de dos experimentos. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 11

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Desplazamiento sobre gen							
nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	SEQ ID NO DE LA DIANA
308589	unión exón: exón	3	3230	CTTCTGCTTGAGTTACAAAC	94	20	285
308590	unión exón: exón	3	3232	ACCTTCTGCTTGAGTTACAA	98	26	286
308591	unión exón: exón	3	3234	GCACCTTCTGCTTGAGTTAC	92	76	287
308592	unión exón: exón	3	3236	TCGCACCTTCTGCTTGAGTT	96	49	288
308593	unión exón: exón	3	3238	CTTCGCACCTTCTGCTTGAG	80	41	289
308594	unión exón: exón	3	3240	TGCTTCGCACCTTCTGCTTG	88	57	290
308595	unión exón: exón	3	3242	TCTGCTTCGCACCTTCTGCT	82	60	291
308596	unión exón: exón	3	3244	AGTCTGCTTCGCACCTTCTG	94	81	292
308597	unión exón: exón	3	3246	TCAGTCTGCTTCGCACCTTC	91	66	293
308598	unión exón: exón	3	3248	CCTCAGTCTGCTTCGCACCT	85	59	294
308599	unión exón: exón	3	3250	AGCCTCAGTCTGCTTCGCAC	94	79	295
308600	codificante	3	3252	GTAGCCTCAGTCTGCTTCGC	89	72	296
308601	codificante	3	3254	TGGTAGCCTCAGTCTGCTTC	91	63	297
308602	codificante	3	3256	CATGGTAGCCTCAGTCTGCT	92	83	298
308603	codificante	3	3258	GTCATGGTAGCCTCAGTCTG	97	56	299
308604	codificante	3	3260	ATGTCATGGTAGCCTCAGTC	90	73	300
308605	codificante	3	3262	GAATGTCATGGTAGCCTCAG	81	50	301
308606	codificante	3	3264	TTGAATGTCATGGTAGCCTC	97	54	302
308607	codificante	3	3266	ATTTGAATGTCATGGTAGCC	77	9	303

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Desplazamiento sobre gen

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	SEQ ID NO DE LA DIANA
308608	codificante	3	3268	ATATTTGAATGTCATGGTAG	85	70	304
308609	codificante	3	5582	CAGCCACATGCAGCTTCAGG	96	78	305
308610	codificante	3	5584	ACCAGCCACATGCAGCTTCA	90	40	306
308611	codificante	3	5586	TTACCAGCCACATGCAGCTT	95	59	307
308612	codificante	3	5588	GGTTACCAGCCACATGCAGC	90	75	308
308613	codificante	3	5590	TAGGTTACCAGCCACATGCA	87	43	309
308614	codificante	3	5592	TTTAGGTTACCAGCCACATG	92	74	310
308615	codificante	3	5594	CTTTTAGGTTACCAGCCACA	85	45	311
308616	codificante	3	5596	TCCTTTTAGGTTACCAGCCA	81	39	312
308617	codificante	3	5598	GCTCCTTTTAGGTTACCAGC	87	77	313
308618	codificante	3	5600	AGGCTCCTTTTAGGTTACCA	77	61	314
308619	codificante	3	5602	GTAGGCTCCTTTTAGGTTAC	74	69	315
308620	codificante	3	5604	TGGTAGGCTCCTTTTAGGTT	88	69	316
308621	codificante	3	5606	TTTGGTAGGCTCCTTTTAGG	91	56	317

Como se muestra en las tablas 10 y 11, las SEQ ID No 124, 128, 129, 132, 133, 134, 138, 140, 141, 142, 144, 145, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 163, 165, 166, 167, 169, 170, 172, 176, 177, 178, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, y 317 demostraron al menos 30% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B humana en este ensayo y por lo tanto son preferidas. Son más preferidas las SEQ ID No 224, 247 y 262. Las regiones diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferidos" y por lo tanto son sitios preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción. Estos segmentos diana preferidos se muestran en la tabla 18. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos mostrados en las tablas 10 y 11. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en el ácido nucleico diana particular, al que se une el oligonucleótido. También se muestran en la tabla 18 las especies en las que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Ejemplo 31

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi: Dirigido al número de acceso en GenBank M14162.1

Se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando la secuencia publicada (número de acceso en GenBank M14162.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 318). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 12. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la

5 tabla 12 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los

10 residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos en los que las células HepG2 se trataron con los compuestos de la tabla 12 en concentración 150 nM. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 12

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
271009	codificante	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	75	319
271024	codificante	318	8031	GCTCACTGTTTCAGCATCTGG	27	320
271029	codificante	318	8792	TGAGAATCTGGGCGAGGCCC	N.D.	321
271040	codificante	318	11880	GTGCTTCATATTTGCCATCT	0	322
271047	codificante	318	12651	CCTCCCTCATGAACATAGTG	32	323
281647	codificante	318	9851	GACGTCAGAACCTATGATGG	38	324
281647	codificante	318	12561	TGAGTGAGTCAATCAGCTTC	73	325

15 Ejemplo 32

Inhibición antisentido de la apolipoproteína B humana - Desplazamiento sobre gen dirigido al número de acceso en GenBank M14162.1

Se llevó a cabo un "desplazamiento sobre gen" en el que se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a las regiones del ARN de la apolipoproteína B humana (número de acceso en GenBank M14162.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 318) que están cerca del sitio diana de la SEQ ID NO: 319. Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 13. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 13 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Las dosis de tratamiento eran 50 nM y 150 nM y están indicadas en la tabla 13. Los datos son medias de dos

20 experimentos. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

25

30

Tabla 13

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi							
nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	SEQ ID NO DE LA DIANA
308622	codificante	318	3104	GCCTTCTGCTTGAGTTACAA	87	25	326
308623	codificante	318	3106	GCGCCTTCTGCTTGAGTTAC	71	62	327
308624	codificante	318	3108	TCGCGCCTTCTGCTTGAGTT	89	69	328
308625	codificante	318	3110	CTTCGCGCCTTCTGCTTGAG	83	64	329
308626	codificante	318	3116	AGTCTGCTTCGCGCCTTCTG	94	38	330
308627	codificante	318	3118	TCAGTCTGCTTCGCGCCTTC	89	67	331
308628	codificante	318	3120	CCTCAGTCTGCTTCGCGCCT	92	61	332
308629	codificante	318	3122	AGCCTCAGTCTGCTTCGCGC	95	77	333

Como se muestra en las tablas 12 y 13, las SEQ ID No 319, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, y 333 demostraron al menos 30% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B humana en este ensayo y por lo tanto son preferidas. Es más preferida la SEQ ID NO: 319. Las regiones diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferidos" y por lo tanto son sitios preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción. Estos segmentos diana preferidos se muestran en la tabla 18. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos mostrados en las tablas 12 y 13. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en el ácido nucleico diana particular, al que se une el oligonucleótido. También se muestran en la tabla 18 las especies en las que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Ejemplo 33

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Dirigido a la secuencia genómica

Se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando la secuencia publicada (el complemento de los nucleótidos 39835 a 83279 de la secuencia con número de acceso a GenBank NT_022227.9, que representa una secuencia genómica, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 334). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 14. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 14 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos en los que las células HepG2 se trataron con los oligonucleótidos 150 nM de la tabla 14. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 14

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
301049	unión intrón: exón	334	904	TCTGTAAGACAGGAGAAAGA	41	335
301050	unión intrón: exón	334	913	ATTCCTCTTCTGTAAGACA	22	336
301051	unión exón: intrón	334	952	GATGCCTTACTTGGACAGAC	27	337
301052	intrón	334	1945	AGAAATAGCTCTCCCAAGGA	13	338
301053	unión intrón: exón	334	1988	GTCGCATCTTCTAACGTGGG	45	339
301054	unión exón: intrón	334	2104	TCCTCCATACCTTGCAGTTG	0	340
301055	intrón	334	2722	TGGCTCATGTCTACCATATT	49	341
301056	intrón	334	2791	CAGTTGAAATGCAGCTAATG	35	342
301057	intrón	334	3045	TGCAGACTAGGAGTGAAAGT	30	343
301058	intrón	334	3117	AGGAGGATGTCCTTTTATTG	27	344
301059	intrón	334	3290	ATCAGAGCACCAAAGGGAAT	12	345
301060	unión intrón: exón	334	3381	CCAGCTCAACCTGAGAATTC	17	346
301061	unión exón: intrón	334	3527	CATGACTTACCTGGACATGG	52	347
301062	intrón	334	3566	CCTCAGCGGACACACACACA	21	348
301063	intrón	334	3603	GTCACATCCGTGCCTGGTGC	41	349
301064	intrón	334	3864	CAGTGCCTCTGGGACCCAC	60	350
301065	intrón	334	3990	AGCTGCAGTGGCCGATCAGC	50	351
301066	intrón	334	4251	GACCTCCCCAGCCACGTGGA	61	352
301067	intrón	334	4853	TCTGATCACCATACATTACA	45	353
301068	intrón	334	5023	ATTTCCCACTGGGTACTCTC	44	354
301069	intrón	334	5055	GGCTGAAGCCCATGCTGACT	44	355

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
301070	intrón	334	5091	GTTGGACAGTCATTCTTTTG	38	356
301071	intrón	334	5096	CACTTGTTGGACAGTCATTC	48	357
301072	intrón	334	5301	ATTTTAAATTACAGTAGATA	43	358
301073	intrón	334	5780	CTGTTCTCCACCCATATCAG	37	359
301074	unión intrón: exón	334	6353	GAGCTCATACCTGTCCCAGA	75	360
301075	intrón	334	6534	TTCAAGGGCCACTGCTATCA	52	361
301076	intrón	334	6641	CCAGTATTTACGCCAATCC	36	362
301077	intrón	334	6661	GGCAGGAGGAACCTCGGGCA	55	363
301078	intrón	334	6721	TTTTAAAATTAGACCCAACC	22	364
301079	intrón	334	6727	TGACTGTTTTAAAATTAGAC	20	365
301080	intrón	334	6788	CCCAGCAAACACAGGTGAAG	25	366
301081	intrón	334	7059	GAGTGTGGTCTTGCTAGTGC	46	367
301082	intrón	334	7066	CTATGCAGAGTGTGGTCTTG	41	368
301083	intrón	334	7189	AGAAGATGCAACCACATGTA	29	369
301084	unión intrón: exón	334	7209	ACACGGTATCCTATGGAGGA	49	370
301085	unión exón: intrón	334	7365	TGGGACTTACCATGCCTTTG	11	371
301086	intrón	334	7702	GGTTTTGCTGCCCTACATCC	30	372
301087	intrón	334	7736	ACAAGGAGTCCTTGTGCAGA	40	373
301088	intrón	334	8006	ATGTTCACTGAGACAGGCTG	41	374
301089	intrón	334	8215	GAAGGTCCATGGTTCATCTG	0	375
301090	intrón	334	8239	ATTAGACTGGAAGCATCCTG	39	376
301091	intrón	334	8738	GAGATTGGAGACGAGCATTT	35	377
301092	unión exón: intrón	334	8881	CATGACCTACTTGTAGGAGA	22	378

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
301093	intrón	334	9208	TGGATTTGGATACACAAGTT	42	379
301094	intrón	334	9244	ACTCAATATATATTCATTGA	22	380
301095	intrón	334	9545	CAAGGAAGCACACCATGTCA	38	381
301096	unión intrón: exón	334	9563	ATACTTATTCCTGGTAACCA	24	382
301097	intrón	334	9770	GGTAGCCAGAACACCAAGTGT	50	383
301098	intrón	334	9776	ACTAGAGGTAGCCAGAACAC	34	384
301099	intrón	334	10149	ACCACCTGACATCACAGGTT	24	385
301100	intrón	334	10341	TACTGTGACCTATGCCAGGA	55	386
301101	intrón	334	10467	GGAGGTGCTACTGTTGACAT	42	387
301102	intrón	334	10522	TCCAGACTTGCTGAGTCTA	47	388
301103	intrón	334	10547	TCTAAGAGGTAGAGCTAAAG	7	389
301104	intrón	334	10587	CCAGAGATGAGCAACTTAGG	38	390
301105	intrón	334	10675	GGCCATGTAAATTGCTCATC	7	391
301106	intrón	334	10831	AAAGAACTATCCTGTATTC	12	392
301107	unión intrón: exón	334	10946	TTCTTAGTACCTGGAAGATG	23	393
301108	unión exón: intrón	334	11166	CATTAGATACCTGGACACCT	29	394
301109	intrón	334	11337	GTTTCATGGAACCTCAGCGCA	44	395
301110	intrón	334	11457	CTGGAGAGCACCTGCAATAG	35	396
301111	intrón	334	11521	TGAAGGGTAGAGAAATCATA	9	397
301112	unión exón: intrón	334	12111	GGAAACTCACTTGTTGACCG	25	398
301113	intrón	334	12155	AGGTGCAAGATGTTCTCTG	46	399
301114	intrón	334	12162	TGCACAGAGGTGCAAGATGT	16	400
301115	intrón	334	12221	CACAAGAGTAAGGAGCAGAG	39	401

ES 2 420 914 T3

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
301116	intrón	334	12987	GATGGATGGTGAGAAATTAC	33	402
301117	intrón	334	13025	TAGACAATTGAGACTCAGAA	39	403
301118	intrón	334	13057	ATGTGCACACAAGGACATAG	33	404
301119	intrón	334	13634	ACATACAAATGGCAATAGGC	33	405
301120	intrón	334	13673	TAGGCAAAGGACATGAATAG	30	406
301121	codificante	334	14448	TTATGATAGCTACAGAATAA	29	407
301122	unión exón: intrón	334	14567	CTGAGATTACCCGCAGAATC	32	408
301123	intrón	334	14587	GATGTATGTCATATAAAAGA	26	409
301124	unión intrón: exón	334	14680	TTTCCAATGACCTGCATTGA	48	410
301125	intrón	334	15444	AGGGATGGTCAATCTGGTAG	57	411
301126	intrón	334	15562	GGCTAATAAATAGGGTAGTT	22	412
301127	intrón	334	15757	TCCTAGAGCACTATCAAGTA	41	413
301128	unión intrón: exón	334	15926	CCTCCTGGTCCTGCAGTCAA	56	414
301129	intrón	334	16245	CATTTGCACAAGTGTTTGTT	35	415
301130	intrón	334	16363	CTGACACACCATGTTATTAT	10	416
301131	unión intrón: exón	334	16399	CTTTTTTCAGACTAGATAAGA	0	417
301132	unión exón: intrón	334	16637	TCACACTTACCTCGATGAGG	29	418
301133	intrón	334	17471	AAGAAAATGGCATCAGGTTT	13	419
301134	unión intrón: exón	334	17500	CCAAGCCAATCTGAGAAAGA	25	420
301135	unión exón: intrón	334	17677	AAATACACACCTGCTCATGT	20	421
301136	unión exón: intrón	334	17683	CTTCACAAATACACACCTGC	20	422

ES 2 420 914 T3

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
301137	intrón	334	18519	AGTGGAAGTTTGGTCTCATT	41	423
301138	intrón	334	18532	TTGCTAGCTTCAAAGTGGA	44	424
301139	intrón	334	18586	TCAAGAATAAGCTCCAGATC	41	425
301140	intrón	334	18697	GCATACAAGTCACATGAGGT	34	426
301141	intrón	334	18969	TACAAGGTGTTTCTTAAGAA	38	427
301142	intrón	334	19250	ATGCAGCCAGGATGGGCCTA	54	428
301143	unión intrón: exón	334	19340	TTACCATATCCTGAGAGTTT	55	429
301144	intrón	334	19802	GCAAAGGTAGAGGAAGGTAT	32	430
301145	intrón	334	19813	AAGGACCTTCAGCAAAGGTA	36	431
301146	intrón	334	20253	CATAGGAGTACATTTATATA	23	432
301147	intrón	334	20398	ATTATGATAAAATCAATTTT	19	433
301148	intrón	334	20567	AGAAATTTCACTAGATAGAT	31	434
301149	intrón	334	20647	AGCATATTTTGATGAGCTGA	44	435
301150	intrón	334	20660	GAAAGGAAGGACTAGCATAT	39	436
301151	unión intrón: exón	334	20772	CCTCTCCAATCTGTAGACCC	28	437
301152	intrón	334	21316	CTGGATAACTCAGACCTTTG	40	438
301153	intrón	334	21407	AGTCAGAAAACAACCTATTC	11	439
301154	unión intrón: exón	334	21422	CAGCCTGCATCTATAAGTCA	31	440
301155	unión exón: intrón	334	21634	AAAGAATTACCCTCCACTGA	33	441
301156	intrón	334	21664	TCTTTCAAACCTGGCTAGGCA	39	442
301157	intrón	334	21700	GCCTGGCAAAATTCTGCAGG	37	443
301158	intrón	334	22032	CTACCTCAAATCAATATGTT	28	444
301159	intrón	334	22048	TGCTTTACCTACCTAGCTAC	36	445

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
301160	intrón	334	22551	ACCTTGTGTGTCTCACTCAA	49	446
301161	intrón	334	22694	ATGCATTCCCTGACTAGCAC	34	447
301162	intrón	334	22866	CATCTCTGAGCCCCTTACCA	24	448
301163	intrón	334	22903	GCTGGGCATGCTCTCTCCCC	51	449
301164	intrón	334	22912	GCTTTCGCAGCTGGGCATGC	55	450
301165	intrón	334	23137	ACTCCTTTCTATACCTGGCT	47	451
301166	intrón	334	23170	ATTCTGCCTCTTAGAAAGTT	38	452
301167	intrón	334	23402	CCAAGCCTCTTTACTGGGCT	29	453
301168	intrón	334	23882	CACTCATGACCAGACTAAGA	35	454
301169	intrón	334	23911	ACCTCCCAGAAGCCTTCCAT	22	455
301170	intrón	334	24184	TTCATATGAAATCTCCTACT	40	456
301171	intrón	334	24425	TATTTAATTTACTGAGAAAC	7	457
301172	unión intrón: exón	334	24559	TAATGTGTTGCTGGTGAAGA	35	458
301173	unión exón: intrón	334	24742	CATCTCTAACCTGGTGTCCC	21	459
301174	intrón	334	24800	GTGCCATGCTAGGTGGCCAT	37	460
301175	intrón	334	24957	AGCAAATTGGGATCTGTGCT	29	461
301176	intrón	334	24991	TCTGGAGGCTCAGAAACATG	57	462
301177	intrón	334	25067	TGAAGACAGGGAGCCACCTA	40	463
301178	intrón	334	25152	AGGATTCCCAAGACTTTGGA	38	464
301179	unión intrón: exón	334	25351	CAGCTCTAATCTAAAGACAT	22	465
301180	unión exón: intrón	334	25473	GAATACTCACCTTCTGCTTG	6	466
301181	intrón	334	26047	ATCTCTCTGTCCTCATCTTC	28	467
301182	intrón	334	26749	CCAACTCCCCCTTTCTTTGT	37	468

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
301183	intrón	334	26841	TCTGGGCCAGGAAGACACGA	68	469
301184	intrón	334	27210	TATTGTGTGCTGGGCACTGC	52	470
301185	unión intrón: exón	334	27815	TGCTTCGCACCTGGACGAGT	51	471
301186	unión exón: intrón	334	28026	CCTTCTTTACCTTAGGTGGC	37	472
301187	intrón	334	28145	GCTCTCTCTGCCACTCTGAT	47	473
301188	intrón	334	28769	AACTTCTAAAGCCAACATTC	27	474
301189	unión intrón: exón	334	28919	TGTGTCACAACCTATGGTAAA	63	475
301190	unión exón: intrón	334	29095	AGACACATACCATAATGCCA	22	476
301191	unión intrón: exón	334	29204	TTCTCTTCATCTGAAAATAC	21	477
301192	intrón	334	29440	TGAGGATGTAATTAGCACTT	27	478
301193	unión intrón: exón	334	29871	AGCTCATTGCCTACAAAATG	31	479
301194	intrón	334	30181	GTTCTCATGTTTACTAATGC	40	480
301195	intrón	334	30465	GAATTGAGACAACTTGATTT	26	481
301196	unión intrón: exón	334	30931	CCGGCCATCGCTGAAATGAA	54	482
301197	unión exón: intrón	334	31305	CATAGCTCACCTTGACATT	28	483
301198	intrón	334	31325	CGGTGCACCCTTTACCTGAG	28	484
301199	unión intrón: exón	334	31813	TCTCCAGATCCTAACATAAA	19	485
301200	intrón	334	39562	TTGAATGACACTAGATTTTC	37	486
301201	intrón	334	39591	AAAATCCATTTTCTTTAAAG	12	487
301202	intrón	334	39654	CAGCTCACACTTATTTTAAA	7	488
301203	unión intrón:	334	39789	GTTCCCAAACTGTATAGGA	36	489

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
	exón					
301204	unión exón: intrón	334	39904	AGCTCCATACTGAAGTCCTT	37	490
301205	intrón	334	39916	CAATTCAATAAAAGCTCCAT	31	491
301206	intrón	334	39938	GTTTTCAAAAGGTATAAGGT	28	492
301207	unión intrón: exón	334	40012	TTCCCATTCCTGAAAGCAG	13	493
301208	unión exón: intrón	334	40196	TGGTATTTACCTGAGGGCTG	21	494
301209	intrón	334	40412	ATAAATAATAGTGCTGATGG	39	495
301210	intrón	334	40483	CTATGGCTGAGCTTGCCTAT	33	496
301211	intrón	334	40505	CTCTCTGAAAAATATACCCT	17	497
301212	intrón	334	40576	TTGATGTATCTCATCTAGCA	41	498
301213	intrón	334	40658	TAGAACCATGTTTGGTCTTC	35	499
301214	intrón	334	40935	TTTCTCTTTATCACATGCCC	29	500
301215	intrón	334	41066	TATAGTACACTAAACTTCA	1	501
301216	unión intrón: exón	334	41130	CTGGAGAGGACTAAACAGAG	49	502

Como se muestra en la tabla 14, las SEQ ID No 335, 339, 341, 342, 343, 347, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 367, 368, 370, 372, 373, 374, 376, 377, 379, 381, 383, 384, 386, 387, 388, 390, 395, 396, 399, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 408, 410, 411, 413, 414, 415, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 434, 435, 436, 438, 440, 441, 442, 443, 445, 446, 447, 449, 450, 451, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 463, 464, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 475, 479, 480, 482, 486, 489, 490, 491, 495, 496, 498, 499, y 502 demostraron al menos 30% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B humana en este ensayo, y por lo tanto son preferidas. Las regiones diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferidos" y por lo tanto son preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción. Estos segmentos diana preferidos se muestran en la tabla 18. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos mostrados en la tabla 14. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en el ácido nucleico diana particular, al que se une el oligonucleótido. También se muestran en la tabla 18 las especies en las que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Ejemplo 34

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Dirigido al número de acceso en GenBank AI249040.1

Se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones diana del ARN de la apolipoproteína B humana, usando la secuencia publicada (el complemento de la secuencia con número de acceso en GenBank AI249040.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 503). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 15. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 15 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos en los que las células HepG2 se trataron con los oligonucleótidos 150 nM de la tabla 15. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 15

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi							
n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA	
301218	3'UTR	503	484	ACATTTTATCAATGCCCTCG	23	504	
301219	3'UTR	503	490	GCCAGAACATTTTATCAATG	35	505	
301220	3'UTR	503	504	AGAGGTTTTGCTGTGCCAGA	51	506	
301221	3'UTR	503	506	CTAGAGGTTTTGCTGTGCCA	61	507	
301222	3'UTR	503	507	TCTAGAGGTTTTGCTGTGCC	14	508	
301223	3'UTR	503	522	AATCACACTATGTGTTCTAG	26	509	
301224	3'UTR	503	523	AAATCACACTATGTGTTCTA	33	510	
301225	3'UTR	503	524	TAAATCACACTATGTGTTCT	3	511	
301226	3'UTR	503	526	CTTAAATCACACTATGTGTT	39	512	
301227	3'UTR	503	536	TATTCTGTACTTAAATCAC	23	513	

Como se muestra en la tabla 15, las SEQ ID No 505, 506, 507, 510, y 512 demostraron al menos 30% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B humana en este ensayo y por lo tanto son preferidas. Las regiones diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferidos" y por lo tanto son sitios preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción. Estos segmentos diana preferidos se muestran en la tabla 18. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos mostrados en la tabla 15. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en el ácido nucleico diana particular, al que se une el oligonucleótido. También se muestran en la tabla 18 las especies en las que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Ejemplo 35

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Variación en la posición del hueco

Se diseñó una serie de compuestos antisentido para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando secuencias publicadas (número de acceso en GenBank NM_000384.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 3). Los compuestos se muestran en la Tabla 16. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la

5 tabla 16 son oligonucleótidos quiméricos ("gámpmeros") de 20 nucleótidos de longitud. La región de "hueco" consiste en 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" compuestas de 2'-metoxietil (2'-MOE)nucleótidos. El número de 2'-MOE-nucleótidos en cada lado del hueco varía de modo que el número total de 2'-MOE-nucleótidos es siempre igual a 10 y la longitud total del oligonucleótido quimérico es 20 nucleótidos. La estructura exacta de cada oligonucleótido se designa en la tabla 16 como "estructura del hueco" y los 2'-desoxinucleótidos están en negrilla. Una designación de 8-10-2, por ejemplo, indica que los primeros (los más 5') 8 nucleótidos y los últimos (los más 3') 2 nucleótidos son 2'-MOE-nucleótidos y los 10 nucleótidos en el hueco son 2'-desoxinucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos mostrados en la tabla 16 son medias de tres experimentos en los que se trataron células HepG2 con oligonucleótidos antisentido de la presente descripción con dosis de 50 nM y 150 nM. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 16

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi variable							
nº de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	estructura del hueco	SEQ ID NO DE LA DIANA
308631	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	94	74	0~10~10	224
308632	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	97	41	0~10~10	247
308634	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	67	45	10~10~0	224
308635	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	93	69	10~10~0	247
308637	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	95	79	1~10~9	224
308638	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	94	91	1~10~9	247
308640	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	96	76	2~10~8	224
308641	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	89	77	2~10~8	247
308643	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	96	56	3~10~7	224
308644	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	93	71	3~10~7	247
308646	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	76	50	4~10~6	224
308647	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	86	53	4~10~6	247
308649	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	91	68	6-10-4	224
308650	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	94	74	6~10~4	247
308652	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	95	73	7-10-3	224
308653	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	89	73	7~10~3	247
308655	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCCAG	83	84	8~10~2	224

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi variable

nº de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	estructura del hueco	SEQ ID NO DE LA DIANA
308656	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	97	37	8~10~2	247
308658	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	78	86	9~10~1	224
308659	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	93	70	9~10~1	247
308660	3	3254	TGGTAGCCTCAGTCTGCTTC	92	72	2~10~8	514
308662	3	3254	TGGTAGCCTCAGTCTGCTTC	83	76	8~10~2	514

Como se muestra en la tabla 16, las SEQ ID No 224, 247 y 514 demostraron al menos 30% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B humana en este ensayo con ambas dosis. Estos datos sugieren que los oligonucleótidos son eficaces con una serie de variaciones en la situación del hueco. Las regiones diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferidos" y por lo tanto son sitios preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción. Estos segmentos diana preferidos se muestran en la tabla 18. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos mostrados en la tabla 16. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en el ácido nucleico diana particular, al que se une el oligonucleótido. También se muestran en la tabla 18 las especies en las que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Ejemplo 36

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Variación en la posición del hueco de las SEQ ID No: 319 y 515

Se diseñaron una serie de compuestos antisentido basados en las SEQ ID No 319 y 515, con variaciones en la estructura del hueco. Los compuestos se muestran en la Tabla 17. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 17 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud. La región de "hueco" consiste en 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" compuestas de 2'-metoxietil (2'-MOE)nucleótidos. El número de 2'-MOE-nucleótidos en cada lado del hueco varía de modo que el número total de 2'-MOE-nucleótidos es siempre igual a 10 y la longitud total del oligonucleótido quimérico es 20 nucleótidos. La estructura exacta de cada oligonucleótido se designa en la tabla 17 como "estructura del hueco" y los 2'-desoxinucleótidos están en negrilla. Una designación de 8-10-2, por ejemplo, indica que los primeros (los más 5') 8 nucleótidos y los últimos (los más 3') 2 nucleótidos son 2'-MOE-nucleótidos y los 10 nucleótidos en el hueco son 2'-desoxinucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos mostrados en la tabla 17 son medias de tres experimentos en los que se trataron células HepG2 con oligonucleótidos antisentido de la presente descripción con dosis de 50 nM y 150 nM. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 17

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi variable

nº de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	estructura del hueco	SEQ ID NO DE LA DIANA
308630	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	89	69	0-10-10	319

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi variable

n° de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	estructura del hueco	SEQ ID NO DE LA DIANA
308633	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	83	66	10-10-0	319
308636	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	91	81	1-10-9	319
308639	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	94	86	2-10-8	319
308642	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	95	85	3-10-7	319
308645	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	98	57	4-10-6	319
308648	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	89	78	6-10-4	319
308651	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	88	87	7-10-3	319
308654	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	90	81	8-10-2	319
308657	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	78	61	9-10-1	319
308661	318	3116	AGTCTGCTTCGCGCCTTCTG	91	70	2-10-8	515
308663	318	3116	AGTCTGCTTCGCGCCTTCTG	84	44	8-10-2	515

Como se muestra en la tabla 17, las SEQ ID No , 319 y 515 demostraron al menos 44% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B humana en este ensayo para cualquiera de las dosis. Estos datos sugieren que los compuestos son eficaces con una serie de variaciones en la situación del hueco. Las regiones diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferidos" y por lo tanto son sitios preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción. Estos segmentos diana preferidos se muestran en la tabla 18. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos mostrados en la tabla 17. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en el ácido nucleico diana particular, al que se une el oligonucleótido. También se muestran en la tabla 18 las especies en las que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Tabla 18

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
187342	3	199	GCGCCAGGGCCGAAGAGGAA	124	<i>H. sapiens</i>	516
187346	3	509	CAGGTATGAGCTCAAGCTGG	128	<i>H. sapiens</i>	517
187347	3	584	CATCCTGAACATCAAGAGGG	129	<i>H. sapiens</i>	518
187350	3	756	GGGCAGTGTGATCGCTTCAA	132	<i>H. sapiens</i>	519

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
187351	3	799	CACTTGCTCTCATCAAAGGC	133	<i>H. sapiens</i>	520
187352	3	869	CACACTGGACGCTAAGAGGA	134	<i>H. sapiens</i>	521
187356	3	1459	CGCTGAGCCACGCGGTCAAC	138	<i>H. sapiens</i>	522
187358	3	1859	TGTCCAAATTCTACCATGGG	140	<i>H. sapiens</i>	523
187359	3	2179	CAGCTGACCTCATCGAGATT	141	<i>H. sapiens</i>	524
187360	3	2299	GTCAAGTTCCTGATGGTGTC	142	<i>H. sapiens</i>	525
187362	3	2518	AGCTGCTTCTGATGGGTGCC	144	<i>H. sapiens</i>	526
187363	3	2789	GGGCATCATCATTCCGGACT	145	<i>H. sapiens</i>	527
187365	3	3100	CCTACTATCCGCTGACCGGG	147	<i>H. sapiens</i>	528
187367	3	3449	GGGCCACCTAAGTTGTGACA	148	<i>H. sapiens</i>	529
187368	3	3919	AGAACATGGGATTGCCAGAC	149	<i>H. sapiens</i>	530
187369	3	4089	CTCCACTTCAAGTCTGTGGG	150	<i>H. sapiens</i>	531
187371	3	5146	CAGAGCTTGGCCTCTCTGGG	152	<i>H. sapiens</i>	532
187372	3	5189	TGGCCGCTTCAGGGAACACA	153	<i>H. sapiens</i>	533
187374	3	6049	CAGCTGAGCAGACAGGCACC	155	<i>H. sapiens</i>	534
187375	3	6520	GGGAGAGACAAGTTTCACAT	156	<i>H. sapiens</i>	535
187377	3	6859	GTA CTGCATCCTGGATTCAA	158	<i>H. sapiens</i>	536
187378	3	7459	GTGAGGTGACTCAGAGACTC	159	<i>H. sapiens</i>	537
187379	3	7819	TTGCAGAGCAATATTCTATC	160	<i>H. sapiens</i>	538
187380	3	7861	AAGCATTGGTAGAGCAAGGG	161	<i>H. sapiens</i>	539
187383	3	8589	CCGCTGGCTCTGAAGGAGTC	163	<i>H. sapiens</i>	540
187385	3	8829	TCTAGTCAGGCTGACCTGCG	165	<i>H. sapiens</i>	541
187387	3	9119	GGGCCACAGTGTTCTAACTG	166	<i>H. sapiens</i>	542
187388	3	10159	AATCAAGTGTCATCACA CTG	167	<i>H. sapiens</i>	543

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
187390	3	10349	GGGTAGTCATAACAGTACTG	169	<i>H. sapiens</i>	544
187391	3	10699	AGAGCACACGGTCTTCAGTG	170	<i>H. sapiens</i>	545
187393	3	10839	TTACAGCTAGAGGGCCTCTT	172	<i>H. sapiens</i>	546
187398	3	12149	CACCGTGGGCATGGATATGG	176	<i>H. sapiens</i>	547
187399	3	12265	GGGAATCTGATGAGGAACT	177	<i>H. sapiens</i>	548
187400	3	12380	TGTCAACAAGTACCACTGGG	178	<i>H. sapiens</i>	549
187403	3	12749	ACCTGGGATATACACTAGGG	181	<i>H. sapiens</i>	550
187406	3	13299	CCAAGTATAGTTGGCTGGAC	183	<i>H. sapiens</i>	551
187407	3	13779	TACATGAAGCTTGCTCCAGG	184	<i>H. sapiens</i>	552
197724	3	229	ATGTCAGCCTGGTCTGTCCA	185	<i>H. sapiens</i>	553
197725	3	269	GCACCTCCGGAAGTACACAT	186	<i>H. sapiens</i>	554
197726	3	389	CTGCAGCTTCATCCTGAAGA	187	<i>H. sapiens</i>	555
197727	3	449	TGAGGGCAAAGCCTTGCTGA	188	<i>H. sapiens</i>	556
197728	3	529	CCATTCCAGAAGGGAAGCAG	189	<i>H. sapiens</i>	557
197729	3	709	CGAGGAAGGGCAATGTGGCA	190	<i>H. sapiens</i>	558
197730	3	829	CCTTGTCAACTCTGATCAGC	191	<i>H. sapiens</i>	559
197731	3	849	AGCAGCCAGTCCTGTCACTA	192	<i>H. sapiens</i>	560
197732	3	889	AGCATGTGGCAGAAGCCATC	193	<i>H. sapiens</i>	561
197733	3	1059	GAGAGCACCAAATCCACATC	194	<i>H. sapiens</i>	562
197734	3	1199	CCTCAGTGATGAAGCAGTCA	195	<i>H. sapiens</i>	563
197735	3	1349	GATAGATGTGGTCACCTACC	196	<i>H. sapiens</i>	564
197736	3	1390	CCTCAGCACAGCAGCTGCGA	197	<i>H. sapiens</i>	565
197737	3	1589	GATTCTGCGGGTCATTGGAA	198	<i>H. sapiens</i>	566
197738	3	1678	CAAAGCCATCACTGATGATC	199	<i>H. sapiens</i>	567

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
197739	3	1699	AGAAAGCTGCCATCCAGGCT	200	<i>H. sapiens</i>	568
197740	3	1749	CAGGAGGTTCTTCTTCAGAC	201	<i>H. sapiens</i>	569
197741	3	1829	GAGTCCTTCACAGGCAGATA	202	<i>H. sapiens</i>	570
197742	3	1919	TGCCAATATCTTGAAGCTCAG	203	<i>H. sapiens</i>	571
197743	3	2189	CATCGAGATTGGCTTGAAG	204	<i>H. sapiens</i>	572
197744	3	2649	GGAGCTGGATTACAGTTGCA	205	<i>H. sapiens</i>	573
197745	3	2729	CAACATGCAGGCTGAACTGG	206	<i>H. sapiens</i>	574
197746	3	2949	ACATTACATTTGGTCTCTAC	207	<i>H. sapiens</i>	575
197747	3	3059	CTCAGGCGCTTACTCCAACG	208	<i>H. sapiens</i>	576
197748	3	3118	GGGACACCAGATTAGAGCTG	209	<i>H. sapiens</i>	577
197749	3	3189	GAGCTCCAGAGAGAGGACAG	210	<i>H. sapiens</i>	578
197750	3	3289	ATCGGCAGAGTATGACCTTG	211	<i>H. sapiens</i>	579
197751	3	3488	CAAGGGTGTTATTTCCATAC	212	<i>H. sapiens</i>	580
197752	3	3579	GACTCATCTGCTACAGCTTA	213	<i>H. sapiens</i>	581
197753	3	4039	GCAAATCCTCCAGAGATCTA	214	<i>H. sapiens</i>	582
197754	3	4180	CTCTCCTGGGTGTTCTAGAC	215	<i>H. sapiens</i>	583
197755	3	4299	ATGAAGGCTGACTCTGTGGT	216	<i>H. sapiens</i>	584
197756	3	4511	GGGACCACAGATGTCTGCTT	217	<i>H. sapiens</i>	585
197757	3	4660	CTGGCCGGCTCAATGGAGAG	218	<i>H. sapiens</i>	586
197758	3	4919	GCTGCGTTCTGAATATCAGG	219	<i>H. sapiens</i>	587
197759	3	5009	TGCTGACATCTTAGGCACTG	220	<i>H. sapiens</i>	588
197760	3	5109	AAGTGTAAGTCTCCTGGTGCT	221	<i>H. sapiens</i>	589
197761	3	5212	CAAAATTCAGTCTGGATGGG	222	<i>H. sapiens</i>	590
197762	3	5562	GGGAAACTACGGCTAGAACC	223	<i>H. sapiens</i>	591

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
197763	3	5589	CTGCATGTGGCTGGTAACCT	224	<i>H. sapiens</i>	592
197764	3	5839	CCATGACCATCGATGCACAT	225	<i>H. sapiens</i>	593
197765	3	5869	ATGGGAAACTCGCTCTCTGG	226	<i>H. sapiens</i>	594
197766	3	5979	AGTCATCATCTCGTGTCTAG	227	<i>H. sapiens</i>	595
197767	3	6099	GAATACAGCCAGGACTTGGA	228	<i>H. sapiens</i>	596
197768	3	6144	GGCGTGGAGCTTACTGGACG	229	<i>H. sapiens</i>	597
197769	3	6249	GAGATGAGAGATGCCGTTGA	230	<i>H. sapiens</i>	598
197770	3	6759	AGTCTTGATGAGCACTATCA	231	<i>H. sapiens</i>	599
197771	3	6889	CTAAGTACCAAATCAGAATC	232	<i>H. sapiens</i>	600
197772	3	7149	GTCCATGAGTTAATCGAGAG	233	<i>H. sapiens</i>	601
197773	3	7549	AGGCCACAGTTGCAGTGTAT	234	<i>H. sapiens</i>	602
197774	3	7779	TCTGATTGGTGGACTCTTGC	235	<i>H. sapiens</i>	603
197775	3	7929	GAAGTCAGTCTTCAGGCTCT	236	<i>H. sapiens</i>	604
197776	3	8929	CCAGATTCTCAGATGAGGGA	237	<i>H. sapiens</i>	605
197778	3	10240	CATCTGTCATTGATGCACTG	238	<i>H. sapiens</i>	606
197779	3	10619	AGGAGATGTCAAGGGTTCGG	239	<i>H. sapiens</i>	607
197780	3	10659	GGAACTATTGCTAGTGAGGC	240	<i>H. sapiens</i>	608
197781	3	10899	CTCTCTCCATGGCAAATGTC	241	<i>H. sapiens</i>	609
197783	3	11979	CACCGTGACTTCAGTGCAGA	243	<i>H. sapiens</i>	610
197784	3	12249	ACTGAGTTGAGGGTCCGGGA	244	<i>H. sapiens</i>	611
197786	3	13958	CACATATGAACTGGACCTGC	245	<i>H. sapiens</i>	612
197787	3	14008	TCTGAACTCAGAAGGATGGC	246	<i>H. sapiens</i>	613
216825	3	3249	GGTGCGAAGCAGACTGAGGC	247	<i>H. sapiens</i>	614
216826	3	3	TCCCACCGGGACCTGCGGGG	248	<i>H. sapiens</i>	615

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
216827	3	6	CACCGGGACCTGCGGGGCTG	249	<i>H. sapiens</i>	616
216828	3	23	CTGAGTGCCCTTCTCGGTTG	250	<i>H. sapiens</i>	617
216829	3	35	CTCGGTTGCTGCCGCTGAGG	251	<i>H. sapiens</i>	618
216830	3	36	TCGGTTGCTGCCGCTGAGGA	252	<i>H. sapiens</i>	619
216831	3	37	CGGTTGCTGCCGCTGAGGAG	253	<i>H. sapiens</i>	620
216832	3	39	GTTGCTGCCGCTGAGGAGCC	254	<i>H. sapiens</i>	621
216833	3	43	CTGCCGCTGAGGAGCCCGCC	255	<i>H. sapiens</i>	622
216834	3	116	ACCGCAGCTGGCGATGGACC	256	<i>H. sapiens</i>	623
216835	3	120	CAGCTGGCGATGGACCCGCC	257	<i>H. sapiens</i>	624
216836	3	13800	GAATTACTATCATCCTCTA	258	<i>H. sapiens</i>	625
216838	3	13854	TCCAATTGAACTTTCACATA	260	<i>H. sapiens</i>	626
216839	3	13882	AAAATTCAAAGTGCCTATAT	261	<i>H. sapiens</i>	627
216840	3	13903	GATAAAACCATACAGTGAGC	262	<i>H. sapiens</i>	628
216841	3	13904	ATAAAACCATACAGTGAGCC	263	<i>H. sapiens</i>	629
216842	3	13908	AACCATACAGTGAGCCAGCC	264	<i>H. sapiens</i>	630
216843	3	13909	ACCATACAGTGAGCCAGCCT	265	<i>H. sapiens</i>	631
216844	3	13910	CCATACAGTGAGCCAGCCTT	266	<i>H. sapiens</i>	632
216845	3	13917	GTGAGCCAGCCTTGACAGTAG	267	<i>H. sapiens</i>	633
216846	3	13922	CCAGCCTTGACAGTAGGCAGT	268	<i>H. sapiens</i>	634
216847	3	13934	TAGGCAGTAGACTATAAGCA	269	<i>H. sapiens</i>	635
216848	3	13937	GCAGTAGACTATAAGCAGAA	270	<i>H. sapiens</i>	636
216849	3	13964	TGAACTGGACCTGCACCAAA	271	<i>H. sapiens</i>	637
216850	3	13968	CTGGACCTGCACCAAAGCTG	272	<i>H. sapiens</i>	638
216851	3	13970	GGACCTGCACCAAAGCTGGC	273	<i>H. sapiens</i>	639

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
216852	3	13974	CTGCACCAAAGCTGGCACCA	274	<i>H. sapiens</i>	640
216853	3	13978	ACCAAAGCTGGCACCAGGGC	275	<i>H. sapiens</i>	641
216854	3	13997	CTCGGAAGGTCTCTGAACTC	276	<i>H. sapiens</i>	642
216855	3	14012	AACTCAGAAGGATGGCATT	277	<i>H. sapiens</i>	643
216856	3	14014	CTCAGAAGGATGGCATTTTT	278	<i>H. sapiens</i>	644
216857	3	14049	ATCAGGATCTGAGTTATTTT	279	<i>H. sapiens</i>	645
216858	3	14052	AGGATCTGAGTTATTTTGCT	280	<i>H. sapiens</i>	646
216859	3	14057	CTGAGTTATTTTGCTAACT	281	<i>H. sapiens</i>	647
216860	3	14064	ATTTTGCTAACTTGGGGGA	282	<i>H. sapiens</i>	648
216861	3	14071	TAACTTGGGGGAGGAGGAA	283	<i>H. sapiens</i>	649
217030	3	14087	GGAACAAATAAATGGAGTCT	284	<i>H. sapiens</i>	650
224316	3	3230	GTTTGTAAGTCAAGCAGAAGI	285	<i>H. sapiens</i>	651
224317	3	3232	TTGTAAGTCAAGCAGAAGGT	286	<i>H. sapiens</i>	652
224318	3	3234	GTAAGTCAAGCAGAAGGTGC	287	<i>H. sapiens</i>	653
224319	3	3236	AACTCAAGCAGAAGGTGCGA	288	<i>H. sapiens</i>	654
224320	3	3238	CTCAAGCAGAAGGTGCGAAG	289	<i>H. sapiens</i>	655
224321	3	3240	CAAGCAGAAGGTGCGAAGCA	290	<i>H. sapiens</i>	656
224322	3	3242	AGCAGAAGGTGCGAAGCAGA	291	<i>H. sapiens</i>	657
224323	3	3244	CAGAAGGTGCGAAGCAGACT	292	<i>H. sapiens</i>	658
224324	3	3246	GAAGGTGCGAAGCAGACTGA	293	<i>H. sapiens</i>	659
224325	3	3248	AGGTGCGAAGCAGACTGAGG	294	<i>H. sapiens</i>	660
224326	3	3250	GTGCGAAGCAGACTGAGGCT	295	<i>H. sapiens</i>	661
224327	3	3252	GCGAAGCAGACTGAGGCTAC	296	<i>H. sapiens</i>	662
224328	3	3254	GAAGCAGACTGAGGCTACCA	297	<i>H. sapiens</i>	663

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
224329	3	3256	AGCAGACTGAGGCTACCATG	298	<i>H. sapiens</i>	664
224330	3	3258	CAGACTGAGGCTACCATGAC	299	<i>H. sapiens</i>	665
224331	3	3260	GACTGAGGCTACCATGACAT	300	<i>H. sapiens</i>	666
224332	3	3262	CTGAGGCTACCATGACATTC	301	<i>H. sapiens</i>	667
224333	3	3264	GAGGCTACCATGACATTCAA	302	<i>H. sapiens</i>	668
224334	3	3266	GGCTACCATGACATTCAAAT	303	<i>H. sapiens</i>	669
224335	3	3268	CTACCATGACATTCAAATAT	304	<i>H. sapiens</i>	670
224336	3	5582	CCTGAAGCTGCATGTGGCTG	305	<i>H. sapiens</i>	671
224337	3	5584	TGAAGCTGCATGTGGCTGGT	306	<i>H. sapiens</i>	672
224338	3	5586	AAGCTGCATGTGGCTGGTAA	307	<i>H. sapiens</i>	673
224339	3	5588	GCTGCATGTGGCTGGTAACC	308	<i>H. sapiens</i>	674
224340	3	5590	TGCATGTGGCTGGTAACCTA	309	<i>H. sapiens</i>	675
224341	3	5592	CATGTGGCTGGTAACCTAAA	310	<i>H. sapiens</i>	676
224342	3	5594	TGTGGCTGGTAACCTAAAAG	311	<i>H. sapiens</i>	677
224343	3	5596	TGGCTGGTAACCTAAAAGGA	312	<i>H. sapiens</i>	678
224344	3	5598	GCTGGTAACCTAAAAGGAGC	313	<i>H. sapiens</i>	679
224345	3	5600	TGGTAACCTAAAAGGAGCCT	314	<i>H. sapiens</i>	680
224346	3	5602	GTAACCTAAAAGGAGCCTAC	315	<i>H. sapiens</i>	681
224347	3	5604	AACCTAAAAGGAGCCTACCA	316	<i>H. sapiens</i>	682
224348	3	5606	CCTAAAAGGAGCCTACCAAA	317	<i>H. sapiens</i>	683
187366	318	3121	GGCGCGAAGCAGACTGAGGC	319	<i>H. sapiens</i>	684
187404	318	12651	CACTATGTTTCATGAGGGAGG	323	<i>H. sapiens</i>	685
197777	318	9851	CCATCATAGGTTCTGACGTC	324	<i>H. sapiens</i>	686
197785	318	12561	GAAGCTGATTGACTCACTCA	325	<i>H. sapiens</i>	687

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
224349	318	3104	TTGTAAGTCAAGCAGAAGGC	326	<i>H. sapiens</i>	688
224350	318	3106	GTAAGTCAAGCAGAAGGCGC	327	<i>H. sapiens</i>	689
224351	318	3108	AACTCAAGCAGAAGGCGCGA	328	<i>H. sapiens</i>	690
224352	318	3110	CTCAAGCAGAAGGCGCGAAG	329	<i>H. sapiens</i>	691
224353	318	3116	CAGAAGGCGCGAAGCAGACT	330	<i>H. sapiens</i>	692
224354	318	3118	GAAGGCGCGAAGCAGACTGA	331	<i>H. sapiens</i>	693
224355	318	3120	AGGCGCGAAGCAGACTGAGG	332	<i>H. sapiens</i>	694
224356	318	3122	GCGCGAAGCAGACTGAGGCT	333	<i>H. sapiens</i>	695
224328	3	3254	GAAGCAGACTGAGGCTACCA	514	<i>H. sapiens</i>	696
224353	318	3116	CAGAAGGCGCGAAGCAGACT	515	<i>H. sapiens</i>	697
216862	334	904	TCTTTCTCCTGTCTTACAGA	335	<i>H. sapiens</i>	698
216866	334	1988	CCCACGTTAGAAGATGCGAC	339	<i>H. sapiens</i>	699
216868	334	2722	AATATGGTAGACATGAGCCA	341	<i>H. sapiens</i>	700
216869	334	2791	CATTAGCTGCATTTCAACTG	342	<i>H. sapiens</i>	701
216870	334	3045	ACTTTCACCTCCTAGTCTGCA	343	<i>H. sapiens</i>	702
216874	334	3527	CCATGTCCAGGTAAGTCATG	347	<i>H. sapiens</i>	703
216876	334	3603	GCACCAGGCACGGATGTGAC	349	<i>H. sapiens</i>	704
216877	334	3864	GTGGGGTCCCAGAGGCACTG	350	<i>H. sapiens</i>	705
216878	334	3990	GCTGATCGGCCACTGCAGCT	351	<i>H. sapiens</i>	706
216879	334	4251	TCCACGTGGCTGGGGAGGTC	352	<i>H. sapiens</i>	707
216880	334	4853	TGTAATGTATGGTGATCAGA	353	<i>H. sapiens</i>	708
216881	334	5023	GAGAGTACCCAGTGGGAAAT	354	<i>H. sapiens</i>	709
216882	334	5055	AGTCAGCATGGGCTTCAGCC	355	<i>H. sapiens</i>	710
216883	334	5091	CAAAAGAATGACTGTCCAAC	356	<i>H. sapiens</i>	711

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
216884	334	5096	GAATGACTGTCCAACAAGTG	357	<i>H. sapiens</i>	712
216885	334	5301	TATCTACTGTAATTTAAAAT	358	<i>H. sapiens</i>	713
216886	334	5780	CTGATATGGGTGGAGAACAG	359	<i>H. sapiens</i>	714
216887	334	6353	TCTGGGACAGGTATGAGCTC	360	<i>H. sapiens</i>	715
216888	334	6534	TGATAGCAGTGGCCCTTGAA	361	<i>H. sapiens</i>	716
216889	334	6641	GGATTGGCGTGAAATACTGG	362	<i>H. sapiens</i>	717
216890	334	6661	TGCCCAGAGGTTCTCCTGCC	363	<i>H. sapiens</i>	718
216894	334	7059	GCACTAGCAAGACCACACTC	367	<i>H. sapiens</i>	719
216895	334	7066	CAAGACCACACTCTGCATAG	368	<i>H. sapiens</i>	720
216897	334	7209	TCCTCCATAGGATACCGTGT	370	<i>H. sapiens</i>	721
216899	334	7702	GGATGTAGGGCAGCAAAACC	372	<i>H. sapiens</i>	722
216900	334	7736	TCTGCACAAGGACTCCTTGT	373	<i>H. sapiens</i>	723
216901	334	8006	CAGCCTGTCTCAGTGAACAT	374	<i>H. sapiens</i>	724
216903	334	8239	CAGGATGCTTCCAGTCTAAT	376	<i>H. sapiens</i>	725
216904	334	8738	AAATGCTCGTCTCCAATCTC	377	<i>H. sapiens</i>	726
216906	334	9208	AACTTGTGTATCCAAATCCA	379	<i>H. sapiens</i>	727
216908	334	9545	TGACATGGTGTGCTTCCTTG	381	<i>H. sapiens</i>	728
216910	334	9770	AACTTGGTGTCTGGCTACC	383	<i>H. sapiens</i>	729
216911	334	9776	GTGTTCTGGCTACCTCTAGT	384	<i>H. sapiens</i>	730
216913	334	10341	TCCTGGCATAGGTCACAGTA	386	<i>H. sapiens</i>	731
216914	334	10467	ATGTCAACAGTAGCACCTCC	387	<i>H. sapiens</i>	732
216915	334	10522	TAGACTCAGACAAGTCTGGA	388	<i>H. sapiens</i>	733
216917	334	10587	CCTAAGTTGCTCATCTCTGG	390	<i>H. sapiens</i>	734
216922	334	11337	TGCGCTGAGTTCCATGAAAC	395	<i>H. sapiens</i>	735

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
216923	334	11457	CTATTGCAGGTGCTCTCCAG	396	<i>H. sapiens</i>	736
216926	334	12155	CAGAGGAACATCTTGACCT	399	<i>H. sapiens</i>	737
216928	334	12221	CTCTGCTCCTTACTCTTGTG	401	<i>H. sapiens</i>	738
216929	334	12987	GTAATTTCTCACCATCCATC	402	<i>H. sapiens</i>	739
216930	334	13025	TTCTGAGTCTCAATTGTCTA	403	<i>H. sapiens</i>	740
216931	334	13057	CTATGTCCTTGTGTGCACAT	404	<i>H. sapiens</i>	741
216932	334	13634	GCCTATTGCCATTTGTATGT	405	<i>H. sapiens</i>	742
216933	334	13673	CTATTCATGTCCTTTGCCTA	406	<i>H. sapiens</i>	743
216935	334	14567	GATTCTGCGGGTAATCTCAG	408	<i>H. sapiens</i>	744
216937	334	14680	TCAATGCAGGTCATTGGA	410	<i>H. sapiens</i>	745
216938	334	15444	CTACCAGATTGACCATCCCT	411	<i>H. sapiens</i>	746
216940	334	15757	TACTTGATAGTGCTCTAGGA	413	<i>H. sapiens</i>	747
216941	334	15926	TTGACTGCAGGACCAGGAGG	414	<i>H. sapiens</i>	748
216942	334	16245	AACAAACACTTGTGCAAATG	415	<i>H. sapiens</i>	749
216950	334	18519	AATGAGACCAAACCTCCACT	423	<i>H. sapiens</i>	750
216951	334	18532	TTCCACTTTGAAGCTAGCAA	424	<i>H. sapiens</i>	751
216952	334	18586	GATCTGGAGCTTATTCTTGA	425	<i>H. sapiens</i>	752
216953	334	18697	ACCTCATGTGACTTGTATGC	426	<i>H. sapiens</i>	753
216954	334	18969	TTCTTAAGAAACACCTTGTA	427	<i>H. sapiens</i>	754
216955	334	19250	TAGGCCCATCCTGGCTGCAT	428	<i>H. sapiens</i>	755
216956	334	19340	AAACTCTCAGGATATGGTAA	429	<i>H. sapiens</i>	756
216957	334	19802	ATACCTTCCTCTACCTTTGC	430	<i>H. sapiens</i>	757
216958	334	19813	TACCTTTGCTGAAGGTCCTT	431	<i>H. sapiens</i>	758
216961	334	20567	ATCTATCTAGTGAAATTTCT	434	<i>H. sapiens</i>	759

ES 2 420 914 T3

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
216962	334	20647	TCAGCTCATCAAATATGCT	435	<i>H. sapiens</i>	760
216963	334	20660	ATATGCTAGTCCTTCCTTTC	436	<i>H. sapiens</i>	761
216965	334	21316	CAAAGGTCTGAGTTATCCAG	438	<i>H. sapiens</i>	762
216967	334	21422	TGACTTATAGATGCAGGCTG	440	<i>H. sapiens</i>	763
216968	334	21634	TCAGTGGAGGGTAATTCTTT	441	<i>H. sapiens</i>	764
216969	334	21664	TGCCTAGCCAGTTTGAAAGA	442	<i>H. sapiens</i>	765
216970	334	21700	CCTGCAGAATTTTGCCAGGC	443	<i>H. sapiens</i>	766
216972	334	22048	GTAGCTAGGTAGGTAAAGCA	445	<i>H. sapiens</i>	767
216973	334	22551	TTGAGTGAGACACACAAGGT	446	<i>H. sapiens</i>	768
216974	334	22694	GTGCTAGTCAGGGAATGCAT	447	<i>H. sapiens</i>	769
216976	334	22903	GGGGAGAGAGCATGCCCAGC	449	<i>H. sapiens</i>	770
216977	334	22912	GCATGCCCAGCTGCGAAAGC	450	<i>H. sapiens</i>	771
216978	334	23137	AGCCAGGTATAGAAAGGAGT	451	<i>H. sapiens</i>	772
216979	334	23170	AAC TTTCTAAGAGGCAGAAT	452	<i>H. sapiens</i>	773
216981	334	23882	TCTTAGTCTGGTCATGAGTG	454	<i>H. sapiens</i>	774
216983	334	24184	AGTAGGAGATTTTCATATGAA	456	<i>H. sapiens</i>	775
216985	334	24559	TCTTCACCAGCAACACATTA	458	<i>H. sapiens</i>	776
216987	334	24800	ATGGCCACCTAGCATGGCAC	460	<i>H. sapiens</i>	777
216989	334	24991	CATGTTTCTGAGCCTCCAGA	462	<i>H. sapiens</i>	778
216990	334	25067	TAGGTGGCTCCCTGTCTTCA	463	<i>H. sapiens</i>	779
216991	334	25152	TCCAAAGTCTTGGAATCCT	464	<i>H. sapiens</i>	780
216995	334	26749	ACAAAGAAAGGGGGAGTTGG	468	<i>H. sapiens</i>	781
216996	334	26841	TCGTGTCTTCCTGGCCCAGA	469	<i>H. sapiens</i>	782
216997	334	27210	GCAGTGCCCAGCACACAATA	470	<i>H. sapiens</i>	783

Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.						
SITIO ID	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO DE LA DIANA
216998	334	27815	ACTCGTCCAGGTGCGAAGCA	471	<i>H. sapiens</i>	784
216999	334	28026	IGCCACCTAAGGTAAAGAAGG	472	<i>H. sapiens</i>	785
217000	334	28145	ATCAGAGTGGCAGAGAGAGC	473	<i>H. sapiens</i>	786
217002	334	28919	TTTACCATAGTTGTGACACA	475	<i>H. sapiens</i>	787
217006	334	29871	CATTTTGTAGGCAATGAGCT	479	<i>H. sapiens</i>	788
217007	334	30181	GCATTAGTAAACATGAGAAC	480	<i>H. sapiens</i>	789
217009	334	30931	TTCATTTTCAGCGATGGCCGG	482	<i>H. sapiens</i>	790
217013	334	39562	GAAAATCTAGTGTCATTCAA	486	<i>H. sapiens</i>	791
217016	334	39789	TCCTATACAGTTTTGGGAAC	489	<i>H. sapiens</i>	792
217017	334	39904	AAGGACTTCAGTATGGAGCT	490	<i>H. sapiens</i>	793
217018	334	39916	ATGGAGCTTTTATTGAATTG	491	<i>H. sapiens</i>	794
217022	334	40412	CCATCAGCACTATTATTTAT	495	<i>H. sapiens</i>	795
217023	334	40483	ATAGGCAAGCTCAGCCATAG	496	<i>H. sapiens</i>	796
217025	334	40576	TGCTAGATGAGATACATCAA	498	<i>H. sapiens</i>	797
217026	334	40658	GAAGACCAAACATGGTTCTA	499	<i>H. sapiens</i>	798
217029	334	41130	CTCTGTTTAGTCCTCTCCAG	502	<i>H. sapiens</i>	799
217032	503	490	CATTGATAAAATGTTCTGGC	505	<i>H. sapiens</i>	800
217033	503	504	TCTGGCACAGCAAAACCTCT	506	<i>H. sapiens</i>	801
217034	503	506	TGGCACAGCAAAACCTCTAG	507	<i>H. sapiens</i>	802
217037	503	523	TAGAACACATAGTGTGATTT	510	<i>H. sapiens</i>	803
217039	503	526	AACACATAGTGTGATTTAAG	512	<i>H. sapiens</i>	804

Puesto que se ha encontrado por experimentación que estos "segmentos diana preferidos" están abiertos a, y por lo tanto son accesibles para, la hibridación con compuestos antisentido de la presente descripción, un experto en la materia reconocerá o podrá determinar, usando solo experimentación rutinaria, otros aspectos de la descripción que abarcan otros compuestos que hibridan específicamente con estos segmentos diana preferidos y por consiguiente inhiben la expresión de la apolipoproteína B.

Según la presente descripción, los compuestos antisentido incluyen compuestos oligómeros antisentido, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), empalmes alternativos, cebadores, sondas y otros compuestos oligómeros cortos que hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana.

5 Ejemplo 37

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana - dosis-respuesta de los oligonucleótidos

Los 12 oligonucleótidos descritos en los ejemplos 29 y 31 se investigaron más en un estudio de dosis-respuesta. Los oligonucleótidos de control usados en este estudio eran ISIS 18076 (SEQ ID NO: 805) y ISIS 13650 (SEQ ID NO: 806).

10 Todos los compuestos en este estudio, incluyendo los controles eran oligonucleótidos quiméricos ("gápmeros") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de los oligonucleótidos. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.

15 En el experimento de dosis-respuesta, con los niveles de ARNm como criterio de valoración, se trataron células HepG2 con los oligonucleótidos antisentido o los oligonucleótidos de control con dosis de 37, 75, 150, y 300 nM del oligonucleótido. Los datos se obtuvieron por PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente memoria, y son la media de dos experimentos con los niveles de ARNm en los grupos de tratamiento normalizados con respecto a un grupo de control no tratado. Los datos se muestran en la Tabla 19.

20 Tabla 19

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Dosis-respuesta					
	Dosis				
	37 nM	75 nM	150 nM	300 nM	
n° de ISIS	% inhibición				SEQ ID NO DE LA DIANA
271009	82	91	94	96	319
281625	62	76	84	94	224
301014	75	90	96	98	249
301027	80	90	95	96	262
301028	70	79	85	92	263
301029	54	67	79	85	264
301030	64	75	87	92	265
301031	61	82	92	96	266
301034	73	87	93	97	269
301036	67	83	92	95	271
301037	73	85	89	96	272
301045	77	86	94	98	280

Ejemplo 38

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B humana - dosis-respuesta - Intervalo de dosis inferior

Los 7 oligonucleótidos descritos en los ejemplos 29, 31, 35 y 36 se investigaron más en un estudio de dosis-respuesta. Los oligonucleótidos de control usados en este estudio eran ISIS 18076 (SEQ ID NO: 805), ISIS 13650 (SEQ ID NO: 806), y ISIS 129695 (SEQ ID NO: 807).

Todos los compuestos en este estudio, incluyendo los controles eran oligonucleótidos quiméricos ("gápmeros") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de los oligonucleótidos. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.

En el experimento de dosis-respuesta, con los niveles de ARNm como criterio de valoración, se trataron células HepG2 con los oligonucleótidos antisentido o los oligonucleótidos de control con dosis de 12,5, 37, 75, 150 y 300 nM del oligonucleótido. Los datos se obtuvieron por PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente memoria, y son la media de dos experimentos con los niveles de ARNm en los grupos de tratamiento normalizados con respecto a un grupo de control no tratado. Los datos se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Dosis-respuesta						
	Dosis					
	12,5 nM	37 nM	75 nM	150 nM	300 nM	
n° de ISIS	% inhibición					SEQ ID No
271009	67	86	92	94	95	319
281625	44	66	83	85	94	224
301012	63	79	90	92	95	247
308638	42	73	91	96	97	247
308642	59	84	91	97	98	319
308651	57	76	84	90	88	319
308658	29	61	73	78	90	224

Ejemplo 39

Síntesis de ARN

En general, la química de la síntesis de ARN se basa en la incorporación selectiva de diferentes grupos protectores en reacciones intermedias estratégicas. Aunque el experto en la técnica entenderá el uso de grupos protectores en síntesis orgánica, una clase útil de grupos protectores incluye los éteres de sililo. En particular, se usan éteres de sililo voluminosos para proteger el 5'-hidroxilo en combinación con un grupo protector ortoéster lábil frente a ácidos en el 2'-hidroxilo. Este conjunto de grupos protectores se usa después en la tecnología de síntesis en fase sólida convencional. Es importante eliminar en último lugar el grupo protector ortoéster lábil frente a ácidos, después de todas las demás etapas sintéticas. Además, el uso pronto de los grupos protectores sililo durante la síntesis facilita la eliminación cuando se desea, sin la desprotección indeseada del 2'-hidroxilo.

Siguiendo este procedimiento para la protección secuencial del 5'-hidroxilo en combinación con la protección del 2'-hidroxilo mediante grupos protectores que se eliminan de forma diferente y son químicamente lábiles de forma diferente, se sintetizaron los oligonucleótidos de ARN.

Los oligonucleótidos de ARN se sintetizan por pasos. Cada nucleótido se añade de forma secuencial (dirección de 3' a 5') a un oligonucleótido unido a un soporte sólido. El primer nucleósido en el extremo 3' de la cadena está covalentemente unido a un soporte sólido. Se añaden el nucleótido precursor, un ribonucleósido fosforamídita y activador, acoplando la segunda base al extremo 5' del primer nucleósido. El soporte se lava y se remata cualquier grupo 5'-hidroxilo sin reaccionar con anhídrido acético para dar restos 5'-acetilo. Después el enlace se oxida al enlace más estable y finalmente deseado de P(V). Al final del ciclo de adición de nucleótidos, el grupo 5'-sililo se escinde con fluoruro. El ciclo se repite para cada nucleótido que sigue.

Siguiendo la síntesis, los grupos protectores metilo en los fosfatos se escinden en 30 min usando 2-carbamoil-2-cianoetileno-1,1-ditiolato de disodio trihidrato (S_2Na_2) 1 M en DMF. La disolución de desprotección se lava del oligonucleótido unido al soporte sólido usando agua. Después, el soporte se trata con metilamina al 40% en agua durante 10 min a 55°C. Esto libera los oligonucleótidos de ARN a la disolución, desprotege las aminas exocíclicas y modifica los grupos 2'. Los oligonucleótidos se pueden analizar por HPLC de intercambio aniónico en esta etapa.

Los grupos 2'-ortoéster son los últimos grupos protectores que se eliminan. El grupo protector ortoéster de monoacetato de etilenglicol desarrollado por Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO), es un ejemplo de un grupo protector ortoéster útil que tiene las siguientes propiedades importantes. Es estable en las condiciones de síntesis del nucleósido fosforamídita y la síntesis del oligonucleótido. Sin embargo, después de la síntesis del oligonucleótido, el oligonucleótido se trata con metilamina que no solo escinde el oligonucleótido del soporte sólido sino que también elimina los grupos acetilo de los ortoésteres. Los sustituyentes 2-etil-hidroxilo resultantes en el ortoéster son menos atractores de electrones que el precursor acetilado. Como resultado, el ortoéster modificado se hace más lábil a la hidrólisis catalizada por ácido. Específicamente, la tasa de escisión es aproximadamente 10 veces más rápida después de eliminar los grupos acetilo. Por lo tanto, el ortoéster tiene suficiente estabilidad con el fin de ser compatible con la síntesis de oligonucleótidos y además, cuando es posteriormente modificado, permite llevar a cabo la desprotección en condiciones acuosas relativamente suaves compatibles con el producto oligonucleótido de ARN final.

Además, los métodos de síntesis de ARN son bien conocidos en la técnica (Scaringe, S. A. Ph.D. Thesis, University of Colorado, 1996; Scaringe, S. A., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 11820-11821; Matteucci, M. D. y Caruthers, M. H. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 3185-3191; Beaucage, S. L. y Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.*, 1981, 22, 1859-1862; Dahl, B. J., et al., *Acta Chem. Scand.*, 1990, 44, 639-641; Reddy, M. P., et al., *Tetrahedron Lett.*, 1994, 25, 4311-4314; Wincott, F. et al., *Nucleic Acids Res.*, 1995, 23, 2677-2684; Griffin, B. E., et al., *Tetrahedron*, 1967, 23, 2301-2313; Griffin, B. E., et al., *Tetrahedron*, 1967, 23, 2315-2331).

Los compuestos de ARN antisentido (oligonucleótidos de ARN) de la presente invención se pueden sintetizar por métodos de la presente memoria o adquirir en Dharmacon Research, Inc (Lafayette, CO). Una vez sintetizados, los compuestos de ARN antisentido complementario se pueden entonces reasociar de forma estable por métodos conocidos en la técnica para formar compuestos antisentido bicatenarios (dúplex) Por ejemplo, se pueden formar dúplex combinando 30 μ l de cada una de las cadenas complementarias de los oligonucleótidos de ARN (disolución de oligonucleótido de ARN 50 μ M) y 15 μ l de 5X tampón de reasociación (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM a pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM) seguido de calentamiento durante 1 min a 90°C, después 1 h a 37°C. Los compuestos antisentido en forma de dúplex resultantes se pueden usar en kits, ensayos, cribados, u otros métodos para investigar la función de un ácido nucleico diana.

Ejemplo 40

Diseño y cribado de compuestos antisentido en forma de dúplex dirigidos a la apolipoproteína B

Se diseñan una serie de dúplex de ácido nucleico que comprenden los compuestos antisentido de la presente invención y sus complementarios para dirigirlos a la apolipoproteína B. La secuencia de bases nucleicas de la cadena antisentido del dúplex comprende al menos una parte de un oligonucleótido descrito en la presente memoria. Los extremos de las cadenas se pueden modificar por la adición de una o más bases nucleicas naturales o modificadas para formar un extremo saliente. Después se diseña la cadena del mismo sentido del ARN de doble cadena y se sintetiza como el complemento de la cadena antisentido y también puede contener modificaciones o adiciones en los extremos. Por ejemplo, en una realización, ambas cadenas del dúplex del ARNdc serían complementarias alrededor de las bases nucleicas centrales, cada una con extremos salientes en uno o ambos extremos. Las cadenas antisentido y del mismo sentido del dúplex comprenden de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos, o de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos. Alternativamente, las cadenas antisentido y del mismo sentido comprenden 20, 21 ó 22 nucleótidos.

Por ejemplo, un dúplex que comprende una cadena antisentido que tiene la secuencia CGAGAGGCGGACGGGACCG y que tiene un extremo saliente de dos bases nucleicas de desoxitimidina (dT) tendría la siguiente estructura:

cgagaggcggacgggaccgTT	Cadena antisentido
TTgctctccgcctgccctggc	Complemento

En otra realización, un dúplex que comprende una cadena antisentido que tiene la misma secuencia CGAGAGGCGGACGGGACCG se puede preparar con extremos romos (sin extremo saliente en ninguna cadena) como se muestra:



- 5 Las cadenas de ARN de los dúplex se pueden sintetizar por métodos descritos en la presente memoria o se pueden adquirir en Dharmacon Research Inc., (Lafayette, CO). Una vez sintetizadas, las cadenas complementarias se reasocian de forma estable. Se toman partes alícuotas de las cadenas individuales y se diluyen hasta una concentración 50 uM. Una vez diluidas, se combinan 30 ul de cada cadena con 15 ul de una disolución 5X de tampón de reasociación. La concentración final de dicho tampón es acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM a pH 7,4, y acetato de magnesio 2 mM. El volumen final es 75 ul. Esta disolución se incuba durante 1 min a 90°C y después se centrifuga durante 15 s. El tubo se deja asentar durante 1 h a 37°C momento en el que se usan los dúplex de ARNdc en la experimentación. La concentración final de los dúplex de ARNdc es 20 uM. La disolución se puede almacenar congelada (-20°C) y congelar-descongelar hasta 5 veces.

- 15 Una vez preparados, se evalúa la capacidad de los compuestos antisentido en dúplex de modular la expresión de la apolipoproteína B.

- 20 Cuando las células alcanzan 80% de confluencia, se tratan con los compuestos antisentido en dúplex de la invención. Para células cultivadas en placas de 96 pocillos, los pocillos se lavan una vez con 200 µl de medio OPTI-MEM-1 reducido en suero (Gibco BRL) y después se tratan con 130 µl de OPTI-MEM-1 que contiene 12 µg/ml de LIPOFECTIN (Gibco BRL) y el compuesto antisentido dúplex deseado en una concentración final de 200 nM. Después de 5 h de tratamiento, el medio se sustituye por medio de nueva aportación. Las células se recogen 16 h después del tratamiento, momento en el que el ARN se aísla y se mide la reducción de la diana por RT-PCR.

Ejemplo 41

Diseño de ensayos fenotípicos y estudios in vivo para usar los inhibidores de la apolipoproteína B

Ensayos fenotípicos

- 25 Una vez que se han identificado los inhibidores de la apolipoproteína B por los métodos descritos en la presente memoria, los compuestos se investigan más en uno o más ensayos fenotípicos, cada uno con criterios de valoración medibles que predicen la eficacia en el tratamiento de un estado patológico o afección particular. Los ensayos fenotípicos, kits y reactivos para usar son bien conocidos por los expertos en la materia y se usan en la presente memoria para investigar la función y/o la asociación de la apolipoproteína B con la salud y la enfermedad. Los ensayos fenotípicos representativos, que se pueden adquirir en uno o varios proveedores comerciales, incluyen aquellos para determinar la viabilidad celular, citotoxicidad, proliferación o supervivencia celular (Molecular Sondas, Eugene, OR; PerkinElmer, Boston, MA), ensayos basados en proteína, incluyendo ensayos enzimáticos (Panvera, LLC, Madison, WI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; Oncogene Research Products, San Diego, CA), regulación celular, transducción de señales, inflamación, procesos oxidativos y apoptosis (Assay Designs Inc., Ann Arbor, MI), acumulación de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), ensayos de angiogénesis, ensayos de formación de tubos, ensayos de citoquinas y hormonas y ensayos metabólicos (Chemicon International Inc., Temecula, CA; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ).

- 40 En un ejemplo no limitante, las células que se determina que son adecuadas para un ensayo fenotípico particular (es decir, células MCF-7 seleccionadas para estudios de cáncer de mama; adipocitos para estudios de obesidad) se tratan con inhibidores de apolipoproteína B identificados en los estudios in vitro, así como compuestos de control, en las concentraciones óptimas que son determinadas por los métodos descritos antes. Al final del periodo de tratamiento, las células tratadas y no tratadas se analizan por uno o más métodos específicos para el ensayo para determinar los resultados fenotípicos y criterios de valoración.

- 45 Los criterios de valoración fenotípicos incluyen cambios en la morfología celular a lo largo del tiempo o dosis de tratamiento así como cambios en los niveles de componentes celulares tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, hormonas, sacáridos o metales. Las mediciones del estado celular que incluyen pH, estadio del ciclo celular, absorción o excreción de indicadores biológicos por la célula, son también criterios de valoración de interés.

- 50 El análisis del genotipo de la célula (medición de la expresión de uno o más genes de la célula) después de tratamiento, también se usa como un indicador de la eficacia o potencia de los inhibidores de la apolipoproteína B. Los genes distintivos, o aquellos genes que se sospecha que están asociados con un estado patológico, afección o genotipo específicos, se miden tanto en las células tratadas como en las no tratadas.

Estudios In Vivo

Los sujetos individuales de los estudios in vivo descritos en el presente documento son animales vertebrados de sangre caliente, que incluyen seres humanos.

5 El ensayo clínico se somete a controles rigurosos que aseguran que los individuos no se ponen en riesgo de forma innecesaria y que están completamente informados de su función en el estudio.

10 Para tener en cuenta los efectos psicológicos de recibir los tratamientos, se les da a los voluntarios aleatoriamente placebo o inhibidor de apolipoproteína B. Además, para prevenir que los médicos no sean imparciales, no se les informa de si la medicación que están administrando es un inhibidor de apolipoproteína B o un placebo. Usando este procedimiento de aleatorización, cada voluntario tiene la misma probabilidad de que le den el nuevo tratamiento o el placebo.

15 Los voluntarios recibieron el inhibidor de apolipoproteína B o el placebo durante un periodo de 8 semanas, midiéndose los parámetros biológicos asociados con el estado patológico o la afección indicada al principio (medición de los valores iniciales antes de cualquier tratamiento), al final (después del tratamiento final), y a intervalos regulares durante el periodo de estudio. Dichas mediciones incluyen los niveles de moléculas de ácido nucleico que codifican la apolipoproteína B o niveles de proteína apolipoproteína B en fluidos corporales, tejidos u órganos comprados con los niveles antes de tratamiento. Otras mediciones incluyen, pero sin limitar, índices del estado patológico o afección que se va a tratar, peso corporal, presión sanguínea, título del suero de indicadores farmacológicos de la enfermedad o toxicidad así como mediciones ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción).

20 La información registrada para cada paciente incluye la edad (años), género, altura (cm), historia familiar del estado patológico o afección (sí/no), valoración de la motivación (algo/moderada/grande) y número y tipo de regímenes de tratamiento previos para la enfermedad o afección indicadas.

25 Los voluntarios que toman parte en este estudio son adultos sanos (edad de 18 a 65 años) y participan aproximadamente el mismo número de hombres y mujeres en este estudio. Los voluntarios con determinadas características se distribuyen de forma igualitaria en el tratamiento con placebo y con inhibidor de apolipoproteína B. En general, los voluntarios tratados con placebo tienen poca o no tienen respuesta al tratamiento, mientras que los voluntarios tratados con el inhibidor de la apolipoproteína B presentan tendencias positivas en su índice del estado patológico o afección al final del estudio.

Ejemplo 42

30 Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B de conejo por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

35 Se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B de conejo, usando las secuencias publicadas (número de acceso en GenBank X07480.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 808, número de acceso en GenBank M17780.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 809, y se obtuvo una secuencia usando los cebadores descritos previamente (Tanaka, *Journ. Biol. Chem.*, 1993, 268, 12713-12718) que representan el ARNm de la apolipoproteína B de conejo, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 810). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 21. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 21 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de conejo en hepatocitos primarios de conejo por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los hepatocitos primarios de conejo se trataron con los compuestos 150 mM de la tabla 21. Para la apolipoproteína B de conejo los cebadores de la PCR eran:

cebador directo: AAGCACCCCCAATGTCACC (SEQ ID NO: 811)

cebador inverso: GGGATGGCAGAGCCAATGTA (SEQ ID NO: 812) y

50 la sonda para PCR era: FAM- TCCTGGATTCAAGCTTCTATGTGCCTTCA - TAMRA (SEQ ID NO: 813) donde FAM (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador. Los datos son medias de dos experimentos. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 21

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de conejo por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi					
nº de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
233149	808	1	TGCTTGGAGAAGGTAAGATC	0	814
233150	810	1	GCGTTGTCTCCGATGTTCTG	20	815
233151	809	13	TAATCATTAACCTTGCTGTGG	20	816
233152	808	22	TCAGCACGTAGCAATGCATT	0	817
233153	808	31	GCCTGATACTCAGCACGTAG	0	818
233154	809	31	CAATTGAATGTACTCAGATA	18	819
233155	808	51	ACCTCAGTGACTTGTAATCA	47	820
233156	809	51	CACTGGAACTTGTCTCTCC	23	821
233157	809	71	AGTAGTTAGTTTCTCCTTGG	0	822
233159	808	121	TCAGTGCCCAAGATGTCAGC	0	823
233160	810	121	ATTGGAATAATGTATCCAGG	81	824
233161	809	130	TTGGCATTATCCAATGCAGT	28	825
233162	808	151	GTTGCCTTGTGAGCAGCAGT	0	826
233163	810	151	ATTGTGAGTGGAGATACTTC	80	827
233164	809	171	CATATGTCTGAAGTTGAGAC	8	828
233165	808	181	GTAGATACTCCATTTTGGCC	0	829
233166	810	181	GGATCACATGACTGAATGCT	82	830
233167	808	201	TCAAGCTGGTTGTTGCACTG	28	831
233168	808	211	GGACTGTACCTCAAGCTGGT	0	832
233169	808	231	GCTCATTCTCCAGCATCAGG	14	833
233170	809	251	TTGATCTATAATACTAGCTA	23	834
233172	810	282	ATGGAAGACTGGCAGCTCTA	86	835
233173	808	301	TTGTGTTCTTGAAGCGGCC	3	836
233174	809	301	TGTGCACGGATATGATAACG	21	837

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de conejo por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi					
nº de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO DE LA DIANA
233175	810	306	GACCTTGAGTAGATTCCTGG	90	838
233176	810	321	GAAATCTGGAAGAGAGACCT	62	839
233177	808	331	GTAGCTTTCCCATCTAGGCT	0	840
233178	808	346	GATAACTCTGTGAGGGTAGC	0	841
233179	810	371	ATGTTGCCCATGGCTGGAAT	65	842
233180	809	381	AAGATGCAGTACTACTTCCA	13	843
233181	808	382	GCACCCAGAATCATGGCCTG	0	844
233182	809	411	CTTGATACTTGGTATCCACA	59	845
233183	810	411	CAGTGTAATGATCGTTGATT	88	846
233184	810	431	TAAAGTCCAGCATTGGTATT	69	847
233185	810	451	CAACAATGTCTGATTGGTTA	73	848
233186	810	473	GAAGAGGAAGAAAGGATATG	60	849
233187	810	481	TGACAGATGAAGAGGAAGAA	66	850
233188	810	500	TTGTACTGTAGTGCATCAAT	74	851
233189	809	511	GCCTCAATCTGTTGTTTCAG	46	852
233190	810	520	ACTTGAGCGTGCCCTCTAAT	69	853
233191	809	561	GAAATGGAATTGTAGTTCTC	31	854

Ejemplo 43

Inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B de conejo por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi - Estudio de dosis y respuesta

- 5 Un subconjunto de oligonucleótidos antisentido del ejemplo 42 se investigó más en estudios de dosis y respuesta. Las dosis de tratamiento eran 10, 50, 150 y 300 nM. ISIS 233160 (SEQ ID NO: 824), ISIS 233166 (SEQ ID NO: 830), ISIS 233172 (SEQ ID NO: 835), ISIS 233175 (SEQ ID NO: 838), y ISIS 233183 (SEQ ID NO: 846) se analizaron según su efecto en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de conejo en hepatocitos primarios de conejo por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos y se muestran en la tabla 22.
- 10

Tabla 22

Inhibición de los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de conejo por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi				
	Porcentaje de inhibición			
n° de ISIS	300 nM	150 nM	50 nM	10 nM
233160	80	74	67	33
233166	73	79	81	66
233172	84	81	76	60
233175	93	90	85	67
233183	80	81	71	30

Ejemplo 44

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B en ratones LDLr^{-/-} - Dosis-Respuesta

- 5 Los ratones deficientes en el receptor de LDL (ratones LDLr^{-/-}), una cepa que no puede modificar el ARNm de la apolipoproteína B y por lo tanto sintetiza exclusivamente apolipoproteína B-100, tienen niveles de colesterol LDL y apolipoproteína B-100 notablemente elevados y desarrollan aterosclerosis extensa.

- 10 Se usaron ratones LDLr^{-/-} adquiridos en Taconic (Germantown, NY) para evaluar el potencial de los oligonucleótidos antisentido para disminuir los niveles de ARNm o proteína de apolipoproteína B, así como criterios de valoración fenotípicos asociados con la apolipoproteína B. Los ratones LDLr^{-/-} se separaron en grupos de machos y hembras. Se administró a los ratones LDLr^{-/-} por vía intraperitoneal, dos veces a la semana durante 6 semanas, 10, 25 ó 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID NO: 109) o ISIS 270906 (SEQ ID NO: 856) que es ISIS 147764 con 4 apareamientos de bases erróneos, o disolución salina o 20 mg/kg de atorvastatina. Al terminar el estudio, los animales se sacrificaron y se evaluaron varios marcadores fenotípicos.

- 15 ISIS 147764 era capaz de reducir los niveles de colesterol, triglicéridos y ARNm de una forma dependiente de la dosis tanto en los ratones macho como hembra, mientras que ISIS 270906 con 4 apareamientos de bases erróneos no era capaz de hacer esto. Los resultados del estudio se resumen en la tabla 23.

Tabla 23

Efectos del tratamiento con ISIS 147764 en ratones LDLr-/- macho y hembra en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B, enzimas hepáticas, colesterol y triglicéridos.								
	Dosis	Enzimas hepáticas IU/l		Lipoproteínas mg/dl				% de ARNm control
Nº de ISIS	mg/kg	AST	ALT	COL.	HDL	LDL	TRIG.	
Machos								
Disolución Salina		68,4	26,6	279,2	125,4	134,7	170,6	100,0
147764	10	57,6	29,8	314,2	150,0	134,7	198,6	61,7
	25	112,6	78,8	185,0	110,6	66,2	104,2	30,7
	50	163,6	156,8	165,6	107,8	51,2	113,4	16,6

Efectos del tratamiento con ISIS 147764 en ratones LDLr-/- macho y hembra en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B, enzimas hepáticas, colesterol y triglicéridos.								
	Dosis	Enzimas hepáticas IU/l		Lipoproteínas mg/dl				% de ARNm control
Nº de ISIS	mg/kg	AST	ALT	COL.	HDL	LDL	TRIG.	
Machos								
270906	50	167,4	348,0	941,0	244,2	541,9	844,8	N.D.
Atorvastatina	20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	110,9
Hembras								
Disolución Salina		65,0	23,4	265,8	105,8	154,9	121,4	100,0
147764	10	82,0	27,2	269,6	121,0	127,8	140,8	64,2
	25	61,4	32,2	175,8	99,5	68,9	100,4	41,3
	50	134,6	120,4	138,2	92,2	45,9	98,0	18,5
270906	50	96,0	88,6	564,6	200,0	310,0	240,4	N.D.
Atorvastatina	20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D. I	N.D.	N.D.	109,0

Ejemplo 45

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B en macacos cangrejeros

5 Los macacos cangrejeros alimentados con una dieta aterogénica desarrollan aterosclerosis con muchas similitudes con la aterosclerosis de seres humanos. Los macacos cangrejeros hembra comparten varias similitudes en las lipoproteínas y el sistema cardiovascular con seres humanos. Además de estas características, hay similitudes en la biología reproductiva. Las hembras cangrejeras tienen un ciclo menstrual de 28 días como el de las mujeres. Se han medido las concentraciones de hormonas a lo largo del ciclo menstrual de macacos cangrejeros, y la duración de las fases folicular y lútea, así como las concentraciones de estradiol y progesterona en el plasma a lo largo del ciclo, también son notablemente similares a los de las mujeres.

10 Los macacos cangrejeros (machos o hembras) se pueden usar para evaluar el potencial de los oligonucleótidos antisentido para reducir los niveles de proteína o ARNm de la apolipoproteína B, así como criterios de valoración fenotípicos asociados con la apolipoproteína B incluyendo, pero sin limitar, indicadores cardiovasculares, aterosclerosis, enfermedades lipídicas, obesidad, y formación de placa. Un estudio podría incluir monos hipercolesterolémicos inducidos y normales alimentados con dietas que son normales o con alto contenido en lípidos y colesterol. La administración a los macacos cangrejeros puede ser en una variedad de regímenes, siendo uno por vía subcutánea de 10-20 mg/kg de compuesto oligomérico durante 1-2 meses. Los parámetros que se pueden observar durante el periodo de ensayo podrían incluir: colesterol total en el plasma, colesterol LDL, colesterol HDL, triglicéridos, contenido de colesterol en la pared arterial y engrosamiento de la íntima coronaria.

Ejemplo 46

Secuenciación del segmento diana preferido de la apolipoproteína B de macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*)

25 Se amplificó una parte del ARNm de la apolipoproteína B de macaco cangrejero que no está disponible en la técnica. Las posiciones de 2920 a 3420 de la secuencia de ARNm de la apolipoproteína B humana (número de acceso en GenBank NM_000384.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 3) contienen el segmento diana preferido con el cual hibrida ISIS 301012 y se amplificó y secuenció el correspondiente segmentos del ARNm de la apolipoproteína B del macaco cangrejero. El sitio con el que hibrida ISIS 301012 en la

apolipoproteína B humana se amplificó poniendo los cebadores 5' en la posición 2920 y 3' en la posición 3420. Se adquirieron hepatocitos de macaco cangrejero en In Vitro Technologies (Gaithersburg, MD). Se produjeron fragmentos de 500 pb usando ADNc de hepatocitos 1° humanos y de macaco cangrejero y se produjeron por transcripción inversa del ARN total seguido de 40 ciclos de amplificación por PCR. Después de la purificación en gel de los amplicones humano y de macaco cangrejero, se realizaron las reacciones de secuenciación directa e inversa de cada producto mediante Retrogen (se usó el kit de Invitrogen para crear el ADN, monocatenario y proporcionar los reactivos para la reacción de PCR con Amplitaq). La secuencia del macaco cangrejero se incorpora en la presente memoria como SEQ ID NO: 855 y es idéntica en el 96% a las posiciones de 2920 a 3420 del ARNm de la apolipoproteína B humana.

Ejemplo 47

Efectos de la inhibición antisentido del gen de la apolipoproteína B (ISIS 281625 y 301012) en ratones transgénicos C57BL/6NTac-TgN(APOB100)

Los ratones transgénicos C57BL/6NTac-TgN(APOB100) tienen el gen de la apolipoproteína B humana "introducido de sustitución". Estos ratones expresan niveles altos de la apolipoproteína B100 humana que da como resultado ratones con niveles elevados en el suero de colesterol LDL. Estos ratones son útiles para identificar y evaluar compuestos para reducir los niveles elevados de colesterol LDL y el riesgo de aterosclerosis. Cuando se alimentaron con una dieta alta en grasa y colesterol, estos ratones desarrollan una acumulación lipídica significativa debajo del endotelio y en la media, y tienen lesiones ateroscleróticas significativamente más complejas que los animales de control.

Los ratones C57BL/6NTac-TgN(APOB100) se dividieron en dos grupos, un grupo que recibía el tratamiento con oligonucleótido y los animales de control que recibían tratamiento con disolución salina. Después de ayunar durante la noche, se administró a los ratones por vía intraperitoneal dos veces por semana, disolución salina o 25 mg/kg de ISIS 281625 (SEQ ID No: 224) o ISIS 301012 (SEQ ID No: 247) durante 8 semanas. Al terminar el estudio y 48 h después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de ARNm diana en el hígado, niveles de colesterol y triglicéridos y niveles de enzimas hepáticas. Además, se midieron los niveles de apolipoproteína B endógena de ratón en el hígado para evaluar cualquier efecto de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B humana.

Tras el tratamiento con ISIS 281625 o ISIS 301012, los niveles de AST y ALT eran mayores, aunque todavía no superaban los valores normales (≤ 300 IU/l). Los niveles de colesterol eran ligeramente mayores con respecto al tratamiento con disolución salina, mientras que los niveles de triglicéridos eran ligeramente menores. El tratamiento con cualquiera de esos oligonucleótidos dirigidos a la apolipoproteína B humana que es expresada en estos ratones, disminuyó notablemente los niveles de ARNm de la apolipoproteína humana, mientras que los niveles de la apolipoproteína B endógena de ratón no se afectaron, indicando que estos oligonucleótidos presentan especificidad por la apolipoproteína B humana. Los resultados de los estudios comparativos se muestran en la tabla 24.

Tabla 24

Efectos del tratamiento con ISIS 281625 y 301012 en ratones en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B, enzimas hepáticas, colesterol y triglicéridos.				
			Nº de ISIS	
		Disolución salina	281625	301012
Enzimas hepáticas IU/l				
	AST	70,3	265,8	208,4
	ALT	32,8	363,8	137,4
Lipoproteínas mg/dl				
	COL.	109,5	152,0	145,1
	HDL	67,3	84,6	98,6

Efectos del tratamiento con ISIS 281625 y 301012 en ratones en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B, enzimas hepáticas, colesterol y triglicéridos.				
			Nº de ISIS	
		Disolución salina	281625	301012
	LDL	30,2	49,8	36,6
	TRIG.	194,5	171,1	157,8
% de ARNm control				
	ARNm humano	100,0	45,2	23,7
	ARNm de ratón	100,0	111,0	94,6

Después de 2 y 4 semanas de tratamiento con ISIS 301012, los niveles de colesterol LDL se redujeron significativamente a 22 mg/dl y 17 mg/dl, respectivamente.

5 Los niveles de la proteína apolipoproteína B en el hígado también se evaluaron al final del periodo de tratamiento de 8 semanas. Se aisló la proteína hepática y se sometió a análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos específicos para la proteína apolipoproteína B humana o de ratón (US Biologicals, Swampscott, MA y Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, respectivamente). El análisis de inmunotransferencia de las muestras de proteínas hepáticas puso de manifiesto una reducción de la expresión de ambas formas de apolipoproteína B humana, la apolipoproteína B-100 y la apolipoproteína B-48. Los niveles de apolipoproteína B de ratón en el hígado no habían cambiado significativamente, de acuerdo con el análisis de inmunotransferencia.

15 También se recogieron muestras de suero a las 2, 4, 6 y 8 semanas y se evaluó la expresión de la apolipoproteína B usando un kit de ELISA específico para la apolipoproteína B humana (ALerCHEK Inc., Portland, ME). La cuantificación de la proteína apolipoproteína B humana en el suero por ELISA puso de manifiesto que el tratamiento con ISIS 281625 reducía la proteína apolipoproteína B humana en el suero en 31, 26, 11 y 26% a las 2, 4, 6 y 8 semanas, respectivamente, con respecto a los animales tratados con disolución salina. El tratamiento con ISIS 301012 redujo la proteína apolipoproteína B humana en el suero en 70, 87, 81 y 41% a las 2, 4, 6 y 8 semanas, respectivamente, con respecto a los animales de control tratados con disolución salina. El suero de los ratones transgénicos también se sometió a análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos específicos contra apolipoproteína B tanto humana como de ratón (US Biologicals, Swampscott, MA y Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, respectivamente). El análisis de inmunotransferencia de las muestras de suero tomadas de los animales, muestra un patrón similar de expresión de la apolipoproteína B humana, con una reducción significativa en el suero de la proteína apolipoproteína B después de 2, 4 y 6 semanas de tratamiento y una ligera reducción a las 8 semanas. La apolipoproteína B de ratón en el suero no cambió significativamente, de acuerdo con el análisis de inmunotransferencia.

25 Ejemplo 48

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 233172, 233175, 281625, 301012, y 301027) en ratones C57BL/6

30 Los ratones C57BL/6, una cepa presentada como susceptible a la formación de placa aterosclerótica inducida por hiperlipidemia, se usaron en los siguientes estudios para evaluar la toxicidad en ratones de varios oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B humana o de ratón.

35 Los ratones C57BL/6 se dividieron en dos grupos, uno que recibía tratamiento con oligonucleótido y animales de control que recibían tratamiento con disolución salina. Después de ayunar durante la noche, se administró a los ratones por vía intraperitoneal dos veces por semana, disolución salina o 25 mg/kg de uno de varios oligonucleótidos durante 2 semanas. Los oligonucleótidos antisentido usados en el presente estudio eran ISIS 233172 (SEQ ID NO: 835) y ISIS 233175 (SEQ ID NO: 838), ambos dirigidos a la apolipoproteína B de conejo, y ISIS 281625 (SEQ ID NO: 224), ISIS 301012 (SEQ ID NO: 247), y ISIS 301027 (SEQ ID NO: 262), dirigidos a la apolipoproteína B humana. Al terminar el estudio y 48 h después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de enzimas hepáticas, peso corporal, peso del hígado, y peso del bazo.

Los niveles de las enzimas hepáticas en ratones eran menores con respecto al tratamiento con disolución salina para tres de los oligonucleótidos antisentido. Sin embargo, el oligonucleótido para conejo ISIS 233175 y el oligonucleótido para ser humano ISIS 301027 produjeron ambos niveles drásticamente mayores de las enzimas hepáticas, indicando toxicidad. Para todos los oligonucleótidos ensayados, el cambio en el peso corporal, del hígado y bazo eran pequeños. Los resultados de los estudios comparativos se muestran en la tabla 25.

Tabla 25

Efectos de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B humana o de ratón en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B, enzimas hepáticas, colesterol y triglicéridos.							
				Nº de ISIS			
		Disolución salina	233172	233175	281625	301012	301027
Enzimas hepáticas							
AST	IU/l	104,5	94,3	346,7	89,5	50,6	455,3
ALT	IU/l	39,5	43,3	230,2	36,2	21,2	221,3
Peso							
corporal		21,2	21,3	21,5	20,9	21,3	21,2
Hígado		1,1	1,3	1,4	1,2	1,1	1,3
Bazo		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Ejemplo 49

Evaluación de la evolución del oligonucleótido con dos dosis diferentes

- 10 Los ratones C57BL/6, una cepa presentada como susceptible a la formación de placa aterosclerótica inducida por hiperlipidemia, se usaron en los siguientes estudios para evaluar la toxicidad en ratones de varios oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B humana.

15 Los ratones hembra C57BL/6 se dividieron en dos grupos, uno que recibía tratamiento con oligonucleótido y animales de control que recibían tratamiento con disolución salina. Después de ayunar durante la noche, se administró a los ratones por vía intraperitoneal dos veces por semana, disolución salina o 25 mg/kg o 50 mg/kg de ISIS 281625 (SEQ ID No: 224), ISIS 301012 (SEQ ID NO: 247), o ISIS 301027 (SEQ ID NO: 262). Después de 2 semanas, se tomó una muestra de sangre de la cola de los ratones y se evaluaron las enzimas hepáticas. Después de 4 semanas y al terminar el estudio, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de enzimas hepáticas.

20 Para ISIS 281625 y ISIS 301012, los niveles de AST y ALT permanecieron cercanos a los de la disolución salina, con cualquiera de las dosis después de 2 semanas. Después 4 semanas, los niveles de AST y ALT mostraron un aumento moderado frente a los animales tratados con disolución salina para la dosis más baja, pero un aumento grande para la dosis más alta. ISIS 301027, administrado con cualquiera de las dosis, mostró un pequeño aumento de los niveles de AST y ALT después de 2 semanas y un gran aumento de los niveles de AST y ALT después de 4 semanas. Los resultados de los estudios se resumen en la tabla 26.

25

Tabla 26

Niveles de AST y ALT en ratones tratados con ISIS 281625, 301012 ó 301027 después de 2 y 4 semanas					
		AST (IU/l)		ALT (IU/l)	
		2 semanas	4 semanas	2 semanas	4 semanas
Disolución salina		49,6	63,2	22,4	25,2
Nº de ISIS	Dosis (mg/kg)				
281625	25	40,8	75	21,2	31,8
	50	44,4	152,4	30,8	210,4
301012	25	37,2	89,8	22,4	24,8
	50	38,4	107,4	23,2	29,2
301027	25	55,4	537,6	27,2	311,2
	50	64	1884	34,8	1194

Ejemplo 50

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147483 y 147764) en ratones ob/ob

- 5 La leptina es una hormona producida por la grasa que regula el apetito. Las deficiencias en esta hormona tanto en seres humanos como en animales no humanos, conduce a la obesidad. Los ratones ob/ob tienen una mutación en el gen de la leptina que da como resultado leptina e hiperglucemia. Como tal, estos ratones son un modelo útil para la investigación de la obesidad y la diabetes, y los tratamientos diseñados para tratar estas afecciones.
- 10 Ratones ob/ob que recibía una dieta alta en grasa, alta en colesterol (60% de kcal de grasa complementada con 0,15% de colesterol) se trataron con uno de los varios oligonucleótidos para evaluar su efecto en los criterios de valoración fenotípicos relacionados con la apolipoproteína B en ratones ob/ob. Después de ayunar durante la noche, se administró a los ratones de cada grupo por vía intraperitoneal, dos veces por semana, 50 mg/kg de ISIS 147483 (SEQ ID No: 79) o 147764 (SEQ ID NO: 109) o los controles ISIS 116847 (SEQ ID NO: 857) o 141923 (SEQ ID NO: 858) o disolución salina, durante 6 semanas. Al terminar el estudio y 48 h después de las inyecciones finales, los
- 15 animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de ARNm diana en el hígado, niveles de colesterol y triglicéridos, niveles de enzimas hepáticas, niveles de glucosa en el suero y niveles de PTEN.

ISIS 147483 y 147764 ambos eran capaces de disminuir los niveles de ARNm de la apolipoproteína B, así como los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos. Los resultados de los estudios comparativos se muestran en la tabla 27.

Tabla 27

Efectos del tratamiento con ISIS 147483 y 147764 en ratones ob/ob en los niveles de ARNm de apolipoproteína B, colesterol, lípidos, triglicéridos, enzimas hepáticas, glucosa y PTEN.						
			Nº de ISIS			
		Disolución salina	116847	141923	147483	147764
Glucosa mg/dl		269,6	135,5	328,5	213,2	209,2
Enzimas hepáticas						
IU/l	AST	422,3	343,2	329,3	790,2	406,5
	ALT	884,3	607,5	701,7	941,7	835,0
Lipoproteínas						
mg/dl	COL.	431,9	287,5	646,3	250,0	286,3
	TRIG.	128,6	196,5	196,5	99,8	101,2
% de ARNm control						
	ApoB	100,0	77,0	100,0	25,2	43,1
	PTEN	100,0	20,0	113,6	143,2	115,3

Ejemplo 51

5 Inhibición antisentido de la apolipoproteína B en ratones alimentados con dieta alta en grasa: efectos dependientes del tiempo

En una realización adicional de la invención, se comparó la inhibición del ARNm de la apolipoproteína B en ratones con la concentración de oligonucleótido en el hígado, colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL. Se evaluaron ratones macho C57B1/6 que recibían una dieta con alto contenido en grasa (60% de grasa) a lo largo del curso de 6 semanas, con inyecciones por vía intraperitoneal dos veces por semana, de 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID NO: 109) o 50 mg/kg del oligonucleótido de control ISIS 141923 (SEQ ID NO: 858). Los animales de control recibieron tratamiento con disolución salina. Los animales se sacrificaron después de 2 días, 1, 2, 4 y 6 semanas de tratamiento. Cada grupo de tratamiento en cada tiempo de medición consistía en 8 ratones.

La expresión de la diana en el hígado se midió por la PCR en tiempo real como se ha descrito por otros ejemplos en la presente memoria y se expresa como porcentaje de inhibición con respecto a los ratones tratados con disolución salina. Los niveles de colesterol total, LDL y HDL se midieron por análisis clínico rutinario usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY) y se presentan en mg/dl. Los resultados de los animales tratados con disolución salina se muestran para la comparación. El oligonucleótido intacto en el tejido hepático se midió por electroforesis en gel capilar y se presenta como microgramos de oligonucleótidos por gramo de tejido. Todos los resultados son la media de 8 animales y se muestran en la tabla 28.

20

Tabla 28

Correlación entre la concentración de fármaco en el hígado, la expresión de ARNm de la apolipoproteína B y los lípidos en el suero durante el tratamiento con ISIS 147764						
		Periodo de tratamiento				
	n° de ISIS	2 días	1 semana	2 semanas	4 semanas	6 semanas
% de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B	141923	9	4	7	0	0
	147764	50	57	73	82	88
Oligonucleótido intacto ug/g	141923	58	61	152	261	631
	147764	85	121	194	340	586
Colesterol total mg/dl	disolución salina	105	152	144	180	191
	141923	99	146	152	169	225
	147764	101	128	121	75	73
Colesterol LDL	disolución salina	8	32	28	50	46
mg/dl	141923	8	27	27	38	56
	147764	7	19	14	7	7
Colesterol HDL mg/dl	disolución salina	74	117	114	127	141
	141923	70	116	122	128	166
	147764	76	107	105	66	64

Estos resultados ilustran que la inhibición del ARNm de la apolipoproteína B por ISIS 147764 ocurría en el espacio de 2 días de tratamiento, aumentaba con los tratamientos sucesivos y persistía durante 6 semanas de tratamiento. La cuantificación de los niveles de oligonucleótido en el hígado pone de manifiesto una fuerte correlación entre la extensión de la inhibición de la diana y la concentración de fármaco en el hígado. Además, a las 1, 2, 3 y 4 semanas de tratamiento, se observa una correlación inversa entre la inhibición del ARNm diana y los niveles de colesterol (total, HDL y LDL), disminuyendo los niveles de colesterol al hacerse mayores el porcentaje de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B. Las muestras de suero se sometieron a análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo para detectar la proteína apolipoproteína B de ratón (Gladstone Institute, San Francisco, CA). La expresión de la proteína sigue el mismo patrón que el del ARNm, con la proteína apolipoproteína B notablemente reducida en el espacio de 48 h y disminuida a lo largo del periodo de tratamiento de 6 semanas.

Los tratamientos con oligonucleótido descritos en este ejemplo se hicieron por duplicado para investigar la extensión con la que persisten los efectos de ISIS 147764 después de cesar el tratamiento. Los ratones se trataron como se ha descrito, y se sacrificaron 1, 2, 4, 6 y 8 semanas después de cesar el tratamiento con oligonucleótido. Se analizaron los mismos parámetros y los resultados se muestran en la tabla 29.

Tabla 29

Correlación entre la concentración de fármaco en el hígado, expresión de ARNm de la apolipoproteína B y lípidos en el suero después de cesar la dosificación						
		Periodo de tratamiento				
	n° de ISIS	1 semana	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
% de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B	141923	15	2	7	11	7
	147764	82	78	49	37	19
Oligonucleótido intacto ug/g	141923	297	250	207	212	128
	147764	215	168	124	70	43
Colesterol total mg/dl	disolución salina	114	144	195	221	160
	141923	158	139	185	186	151
	147764	69	67	111	138	135
Colesterol LDL mg/dl	disolución salina	21	24	34	37	22
	141923	24	24	32	32	24
	147764	14	14	18	24	21
Colesterol HDL mg/dl	disolución salina	86	109	134	158	117
	141923	121	105	135	136	108
	147764	51	49	79	100	94

5 Estos datos demuestran que tras terminar el tratamiento con el oligonucleótido, los efectos de ISIS 147764, incluyendo la inhibición del ARNm de la apolipoproteína B, y disminución del colesterol, persisten durante hasta 8 semanas. Los análisis de inmunotransferencia demuestran que la proteína apolipoproteína B sigue un patrón similar al observado para los niveles de expresión del ARNm.

Ejemplo 52

Efectos de la inhibición antisentido del gen de la apolipoproteína B humana por 301012 en ratones transgénicos C57BL/6NTac-TgN(APOB100): estudio de la dosificación

10 Los ratones transgénicos C57BL/6NTac-TgN(APOB100) tienen el gen de la apolipoproteína B humana "introducido de sustitución". Estos ratones expresan niveles altos de la apolipoproteína B humana que da como resultado ratones con niveles elevados en el suero de colesterol LDL. Estos ratones son útiles para identificar y evaluar compuestos para reducir los niveles elevados de colesterol LDL y el riesgo de aterosclerosis. Cuando se alimentaron con una dieta alta en grasa y colesterol, estos ratones desarrollan una acumulación lipídica significativa debajo del endotelio

y en la media, y tienen lesiones de placa aterosclerótica significativamente más complejas que los animales de control.

Se llevó a cabo un estudio a largo plazo de inhibición de la apolipoproteína B humana por ISIS 301012 en ratones C57BL/6NTac-TgN(APOB100) (Taconic, Germantown, NY) durante un periodo de 3 meses. Se administró a los ratones por vía intraperitoneal dos veces por semana, 10 ó 25 mg/kg de ISIS 301012 (SEQ ID No: 247) durante 12 semanas. Los animales a los que se inyectó disolución salina sirvieron como controles. Cada grupo de tratamiento comprendía 4 animales.

Después de 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de tratamiento, se recogieron muestras de suero con el propósito de medir la proteína apolipoproteína B humana. La proteína en el suero se cuantificó usando un kit de ELISA específico para la apolipoproteína B humana (ALerCHEK Inc., Portland, ME). Los datos se muestran en la tabla 30 y cada resultado representa la media de 4 animales. Los datos están normalizados respecto a los animales de control tratados con disolución salina.

Tabla 30

Reducción de la apolipoproteína B humana en el suero de ratones transgénicos después del tratamiento con ISIS 301012					
	% de reducción en la proteína apolipoproteína B en el suero				
Dosis de oligonucleótido mg/kg	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas	12 semanas
10	76	78	73	42	85
25	80	87	86	47	79

Estos datos ilustran que después de 2, 4, 6 ó 12 semanas de tratamiento con ISIS 301012, el nivel de proteína apolipoproteína B humana en el suero de ratones transgénicos ha disminuido en aproximadamente 80%, demostrando que además de inhibir la expresión del ARNm, ISIS 301012 inhibe eficazmente la expresión de la proteína apolipoproteína B humana en ratones que llevan el transgén de la apolipoproteína B humana. La proteína apolipoproteína B en el suero también se evaluó por análisis de inmunotransferencia, usando un anticuerpo dirigido contra la proteína apolipoproteína B humana (US Biologicals, Swampscott, MA). Este análisis muestra que los niveles de proteína apolipoproteína B humana, tanto de la forma apolipoproteína B-100 como apolipoproteína B-48, disminuyen a las 2, 4, 6 y 12 semanas de tratamiento. El análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo específico para la apolipoproteína B de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) pone de manifiesto que no hay un cambio significativo en la expresión de la proteína de ratón en el suero.

Al principio del tratamiento (inicio) y después de 2, 4, 6 y 8 semanas de tratamiento, se recogieron muestras de suero y se midieron los niveles de colesterol total, HDL y LDL por análisis clínico rutinario usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY), y estos datos se presentan en la tabla 31. Los resultados se presentan como mg/dl y representan la media de 4 animales. También se muestran los animales de control de disolución salina.

Tabla 31

Efectos de ISIS 301012 en los lípidos del suero en ratones transgénicos con apolipoproteína B humana						
		Periodo de tratamiento				
	Tratamiento	Inicio	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
Colesterol total mg/dl	Disolución salina	120	110	129	121	126
	10	115	97	111	120	122
	25	107	101	107	124	147

Efectos de ISIS 301012 en los lípidos del suero en ratones transgénicos con apolipoproteína B humana						
		Periodo de tratamiento				
	Tratamiento	Inicio	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
Colesterol HDL mg/dl	Disolución salina	67	61	69	62	64
	10	70	69	78	72	79
	25	64	73	76	80	91
Colesterol LDL mg/dl	Disolución salina	39	41	50	45	47
	10	35	20	23	37	33
	25	33	19	19	37	44

Estos datos demuestran que el colesterol LDL disminuye por el tratamiento con 10 ó 25 mg/kg de ISIS 147764 durante las primeras 4 semanas de tratamiento.

5 El estudio se terminó 48 h después de las inyecciones finales en las 8 semanas de tratamiento, cuando los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de ARNm diana en el hígado, niveles de proteína apolipoproteína B en el hígado y colesterol en el suero y niveles de enzimas hepáticas. Además, se midió la expresión de los niveles de apolipoproteína B de ratón endógenos en el suero para evaluar cualquier efecto de ISIS 301012 en la expresión del ARNm de la apolipoproteína B.

10 Se midieron los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana y de ratón en los hígados de los animales tratados durante 12 semanas de tratamiento, por PCR en tiempo real como se describe en la presente memoria. Cada resultado representa la media de los datos de 4 animales. Los datos se normalizaron respecto a los controles con disolución salina y se muestran en la tabla 32.

Tabla 32

Efectos de ISIS 301012 en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana y de ratón en ratones transgénicos		
	% inhibición	
	Dosis de ISIS 301012	
especies de ARNm medidas	10 mg/kg	25 mg/kg
apolipoproteína B humana	65	75
apolipoproteína B de ratón	6	6

15 Estos datos demuestran que después de 12 semanas de tratamiento con ISIS 301012, el ARNm de la apolipoproteína B humana se reduce tanto como el 75% en los hígados de ratones transgénicos, mientras que el ARNm de la apolipoproteína B del hígado de ratón no era afectada. Además, el análisis por ELISA de la proteína apolipoproteína B en hígados de ratones transgénicos puso de manifiesto una reducción de 80% y 82% en la proteína humana después de 10 y 20 mg/kg de ISIS 301012, respectivamente. El análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo dirigido contra la apolipoproteína B humana también demuestra una reducción de la expresión de la apolipoproteína B humana, tanto de la forma apolipoproteína B-100 como de la apolipoproteína B-48, en los hígados de ratones transgénicos. El análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo dirigido contra la proteína apolipoproteína B de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) pone de manifiesto que la expresión de la proteína de ratón en el hígado no cambia significativamente.

También se midieron los niveles de ALT y AST en el suero usando el analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY) y mostraron que después del tratamiento con ISIS 301012, los niveles de AST y ALT aumentaron, aunque no superaron los niveles normales (-300 IU/l), indicando falta de toxicidad debido al tratamiento con ISIS 301012.

5 Ejemplo 53

Evaluación de los efectos inmunoestimuladores in vitro de ISIS 301012

La actividad inmunoestimuladora se define por la producción de citoquinas tras exposición a un agente proinflamatorio. En una realización adicional de la invención, se ensayaron la actividad inmunoestimuladora o proinflamatoria de ISIS 301012. Estos estudios los realizaron en MDS Pharma Services (Saint Germain sur l'Arbresle, Francia). Se recogió sangre entera de ratones B6C3F1 sin tratamiento previo, que no habían sido expuestos conscientemente a tratamiento vírico, químico o de radiación. Las células de la sangre cultivadas se expusieron a ISIS 301012 0,5, 5 ó 50 μ M durante un periodo de 14 a 16 h. Oligonucleótidos antisentido que se sabe que tienen actividad proinflamatoria sirvieron como controles positivos. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Al final del periodo de tratamiento, se recogieron los líquidos sobrenadantes y se llevó a cabo el análisis de citoquinas usando un método de citometría de flujo con el kit CBA de inflamación de ratón (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Los resultados pusieron de manifiesto que ISIS 301012 no estimula la liberación de ninguna de las citoquinas ensayadas, que eran la interleuquina 12p70 (IL-12p70), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), interferón gamma (IFN-gamma), interleuquina 6 (IL-6), proteína quimioattractora de macrófagos 1 (MCP-1) e interleuquina 10 (IL-10). Por lo tanto, ISIS 301012 no tiene actividad inmunoestimuladora, según se determinó por el ensayo inmunoestimulador in vitro.

Ejemplo 54

Análisis comparativo genómico de la apolipoproteína B

Se llevó a cabo un análisis genómico comparativo de las secuencias de la apolipoproteína B de ser humano, ratón y mono e ilustró que las secuencias de apolipoproteína B son conservadas entre especies. La organización de los genes de la apolipoproteína B humana y de ratón también se conservan. Los genes humano y de ratón están compuestos por 29 y 26 exones, respectivamente. El ARN de ratón tiene una homología de aproximadamente 81% con la secuencia humana. La secuencia completa y la estructura génica del gen de la apolipoproteína B en primates no humanos no se ha identificado. Sin embargo, como se ilustra en el ejemplo 46, un fragmento de 500 pares de bases que contiene la secuencia diana de ISIS 301012 presenta una identidad de aproximadamente 96% con la secuencia humana.

El sitio de unión para ISIS 301012 está dentro de la región codificante, en el exón 22 del ARNm de la apolipoproteína B humana. Cuando se compararon los sitios de unión de ISIS 301012 de ser humano, ratón y mono, se observó una diversidad de secuencia significativa. Aunque la conservación total de la secuencia entre la de ser humano y la de mono a lo largo de la región de 500 nucleótidos era aproximadamente de 96%, el sitio de unión de ISIS 301012 de la secuencia de mono contiene 2 apareamientos erróneos con respecto a la secuencia humana. Igualmente, aunque la secuencia de ARNm de la apolipoproteína B de ratón tiene una homología de aproximadamente 81% con la humana, en el sitio de unión de ISIS 301012, hay 5 nucleótidos divergentes. Las comparaciones de secuencias para el sitio de unión de ISIS 301012 para las secuencias de la apolipoproteína B humana, de ratón y de mono se muestran en la tabla 33. Los nucleótidos mal apareados con respecto a la secuencia diana de ISIS 301012 están subrayados.

Tabla 33

Comparación del sitio de unión de ISIS 301012 entre las secuencias de apolipoproteína B humana, de mono y de ratón		
Especies	nº de apareamientos erróneos	secuencia diana de ISIS 301012
Ser humano	0	AGGTGCGAAGCAGACTGAGG
Mono	2	aggtgt <u>a</u> aagcagactgagg
Ratón	5	aggagtgcagcagctctgaag

La secuencia diana con la que el oligonucleótido antisentido de ratón ISIS 147764 hibrida está en el exón 24 del gen de la apolipoproteína B de ratón. Las comparaciones de secuencias para el sitio de unión de ISIS 147764 en las

secuencias de la apolipoproteína B de ratón y humana, se muestran en la tabla 34. Los nucleótidos mal apareados con respecto a la secuencia diana de ISIS 147764 están subrayados.

Tabla 34

Comparación del sitio de unión de ISIS 147764 entre las secuencias de apolipoproteína B de ratón y humana		
Especies	nº de apareamientos erróneos	sitio de unión de ISIS 147764
Ser humano	5	gcattgacatcttcaggga <u>c</u>
Ratón	0	gcatggacttctctgga <u>aa</u>

5 Ejemplo 55

Análisis BLAST de ISIS 301012

Se determinó el número de regiones en el genoma humano con las que hibridará ISIS 301012 con complementariedad perfecta. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana se determinó usando los programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamientos locales básica) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, *Genome Res.*, 1997, 7, 649-656). Este análisis evaluaba la complementariedad de secuencia en regiones genómicas o pre-ARNm y en secuencias codificantes.

En regiones genómicas, ISIS 301012 muestra una complementariedad de secuencia perfecta con el gen de la apolipoproteína B solo. No se encontraron secuencias dianas con un apareamiento erróneo con respecto a ISIS 301012. Se encuentran dos apareamientos erróneos entre la secuencia diana de ISIS 301012 y el gen de heparanasa, y se encuentran 3 apareamientos erróneos entre la secuencia diana de ISIS 301012 y 28 sitios genómicos únicos.

En las secuencias de ARN, se encuentra una complementariedad de secuencia perfecta entre ISIS 301012 y el ARNm de la apolipoproteína B y 3 marcadores de secuencia expresados que llevan una similitud moderada con el precursor de la apolipoproteína B humana. Se encuentra un solo apareamiento erróneo entre ISIS 301012 y un marcador de secuencia expresado similar a la forma de la cadena ligera de miosina del músculo liso.

Ejemplo 56

Inhibición antisentido de la apolipoproteína B en hepatocitos humanos primarios: estudios de dosis-respuesta

Los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B humana se ensayaron en estudios de dosis-respuesta en hepatocitos humanos primarios. Los hepatocitos humanos primarios precultivados en placa se adquirieron en InVitro Technologies (Baltimore, MD). Las células se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), 100 unidades/ml y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

Los hepatocitos primarios humanos se trataron con ISIS 301012 (SEQ ID NO: 247) 10, 50, 150 ó 300 nM. Las células no tratadas y las células tratadas con el oligonucleótido de control desordenado ISIS 113529 (CTCTTACTGTGCTGTGGACA, SEQ ID NO: 859) sirvieron como dos grupos de células de control. ISIS 113529 es un oligonucleótido quimérico ("gápmo") de 20 nucleótidos de longitud, compuesto por una región de "hueco" que consta de diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada a ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todas las citidinas son 5-metilcitidinas.

Los oligonucleótidos se introdujeron en las células mediante transfección mediada por LIPOFECTIN como se describe en otros ejemplos de la presente memoria. Las células se recogieron tanto 24 como 48 h después del tratamiento con oligonucleótido, y se aislaron tanto el ARN como la proteína. Además, se recogió el medio de cultivo de las células tratadas para el análisis por ELISA de la secreción de la proteína apolipoproteína B.

La expresión del ARNm de la apolipoproteína B se determinó por PCR en tiempo real de las muestras de ARN como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Cada resultado representa 6 experimentos. Los datos se normalizan respecto a las células de control no tratadas y se muestran en la tabla 35.

Tabla 35

Inhibición del ARNm de la apolipoproteína B por oligonucleótidos antisentido en hepatocitos primarios humanos			
		% de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B	
		n° de ISIS	
Dosis de oligonucleótido	Tratamiento (horas)	301012	113529
10 nM	24	65	N.D.
	48	33	N.D.
50 nM	24	75	N.D.
	48	48	N.D.
150 nM	24	90	16
	48	78	5
300 nM	24	89	10
	48	72	18

Estos datos demuestran que ISIS 301012 inhibe la expresión de la apolipoproteína B de una forma dependiente de la dosis en hepatocitos humanos primarios.

- 5 Se midió la proteína apolipoproteína B secretada al medio celular cultivado en las muestras tratadas con el oligonucleótido 50 y 150 nM, usando un kit de ELISA específico de la proteína diana (ALerCHEK Inc., Portland, ME). Cada resultado representa 3 experimentos. Los datos se normalizan respecto a las células de control no tratadas y se muestran en la tabla 36.

Tabla 36

Inhibición de la secreción de la proteína apolipoproteína B de hepatocitos humanos primarios por ISIS 301012			
		% de cambio en la secreción de la proteína apolipoproteína B	
		n° de ISIS	
Dosis	Tratamiento (horas)	301012	113529
150 nM	24	-57	+6
	48	-75	+4
300 nM	24	-41	-2
	48	-48	-5

Las muestras de proteínas de las dosis de 50, 150 y 300 nM después de 24 h y las dosis de 150 y 300 nM después de 48 h, se sometieron a análisis de inmunotransferencia como se describe en otros ejemplos en la presente memoria, usando el anticuerpo específico de la proteína apolipoproteína B humana adquirido en US Biological (Swampscott, MA). El análisis de inmunotransferencia demuestra que la proteína apolipoproteína B en hepatocitos humanos disminuye de una forma dependiente de la dosis después del tratamiento con oligonucleótido antisentido con ISIS 301012.

Se llevó a cabo un experimento adicional para ensayar los efectos de ISIS 271009 (SEQ ID NO: 319), ISIS 281625 (SEQ ID NO: 224) y ISIS 301027 (SEQ ID NO: 262) en el ARNm de la apolipoproteína B humana en hepatocitos humanos primarios. Las células se cultivaron como se describe en la presente memoria, y se trataron con ISIS 271009, ISIS 281625 o ISIS 301027, 5, 10, 50 ó 150 nM durante un periodo de 24 h. Los oligonucleótidos de control ISIS 13650 (SEQ ID NO: 806) y ISIS 113529 (SEQ ID NO: 859) se usaron en concentración 50 o 150 nM. Se evaluó la expresión del ARNm de la apolipoproteína B humana por PCR en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Se midió la proteína apolipoproteína B secretada al medio celular cultivado en las muestras tratadas con el oligonucleótido 50 y 150 nM, usando un kit de ELISA específico de la proteína diana (ALerCHEK Inc., Portland, ME).

Los datos mostrados en la tabla 37, representan la media de 2 experimentos y están normalizados con respecto a las células de control. Cuando está presente, un "+" indica que la expresión génica era mayor.

Tabla 37

Inhibición antisentido del ARNm de la apolipoproteína B humana por ISIS 271009, ISIS 281625 y ISIS 301027						
	Dosis de oligonucleótido	ISIS 271009	ISIS 281625	ISIS 301027	ISIS 13650	ISIS 113529
% de inhibición de la expresión del ARNm de la apolipoproteína B	5 nM	+4	8	11	N.D.	N.D.
	10 nM	5	22	37	N.D.	N.D.
	50 nM	52	49	50	38	0
	150 nM	81	52	70	26	14
% de inhibición de la secreción de la proteína apolipoproteína B	50 nM	17	18	21	N.D.	N.D.
	150 nM	32	18	32	+18	+1

Estos datos demuestran que ISIS 271009, ISIS 281625 y ISIS 301027 inhiben la expresión del ARNm de la apolipoproteína B de una forma dependiente de la dosis en hepatocitos humanos primarios. ISIS 271009 y ISIS 301027 inhiben la secreción de proteína apolipoproteína B de las células de una forma dependiente de la dosis.

Ejemplo 57

Efectos de los oligonucleótidos antisentido de la apolipoproteína B-100 en la expresión de la apolipoproteína(a)

La lipoproteína (a) [Lp(a)] contiene dos proteínas distintas unidas por disulfuro, la apolipoproteína (a) y la apolipoproteína B (Rainwater y Kammerer, *J. Exp. Zool.*, 1998, 282, 54-61).

Se ensayaron los efectos de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B en la expresión del componente apolipoproteína (a) de la partícula de lipoproteína (a) en hepatocitos humanos primarios.

Los hepatocitos humanos primarios (Invitro Technologies, Baltimore, MD), cultivados y transfectados como se describe en la presente memoria, se trataron con concentraciones 5, 10, 50 ó 150 nM de ISIS 271009 (SEQ ID NO: 319), 281625 (SEQ ID NO: 224), 301012 (SEQ ID NO: 247) o 301027 (SEQ ID NO: 262). Las células también se trataron con concentraciones 50 ó 150 nM de los oligonucleótidos de control ISIS 113529 (SEQ ID NO: 859) o ISIS 13650 (SEQ ID NO: 806). Las células no tratadas sirvieron de control. Después de 24 h de tratamiento con el oligonucleótido, se midió la expresión del ARNm de la apolipoproteína (a) por PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente memoria.

Las sondas y cebadores para la apolipoproteína (a) humana se diseñaron para hibridar con una secuencia de apolipoproteína (a) humana, usando la información de la secuencia publicada (número de acceso en GenBank NM_005577.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 860). Para la apolipoproteína (a) humana los cebadores de la PCR eran:

5 cebador directo: CAGCTCCTTATTGTTATACGAGGGA (SEQ ID NO: 861)

 cebador inverso: TGCGTCTGAGCATTGCGT (SEQ ID NO: 862) y la sonda de la PCR era: FAM-CCCGGTGTCAGGTGGGAGTACTGC-TAMRA (SEQ ID NO: 863) donde FAM es el colorante fluorescentes y TAMRA es el colorante atenuador.

10 Los datos son la media de 3 experimentos y se expresan como porcentaje de inhibición con respecto a los controles no tratados. Los resultados se muestran en la tabla 38. Un "+" o "-" que precede al número indica que la expresión de la apolipoproteína(a) había aumentado o disminuido, respectivamente, después de tratamiento con los oligonucleótidos antisentido.

Tabla 38

Efectos de los oligonucleótidos antisentido de la apolipoproteína B en la expresión de la apolipoproteína (a)						
	% de cambio en la expresión del ARNm de la apolipoproteína (a) después de inhibición antisentido de la apolipoproteína B					
Dosis de oligonucleótido	n° de ISIS					
	271009	281625	301012	301027	13650	113529
5 nM	+70	-9	+34	-16	N.D.	N.D.
10 nM	+31	-23	+86	-45	N.D.	N.D.
50 nM	+25	-34	+30	-39	-68	+14
150 nM	-47	+32	+38	-43	-37	-9

15 Estos resultados ilustran que ISIS 301012 no inhibía la expresión de la apolipoproteína (a) en hepatocitos humanos primarios. ISIS 271009 inhibía la expresión de la apolipoproteína (a) con la dosis más alta. ISIS 281625 y ISIS 301027 disminuían los niveles de ARNm de apolipoproteína(a).

Ejemplo 58

20 Inhibición de la secreción de partículas de lipoproteína (a) con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B-100

Se evaluó la secreción de partículas de lipoproteína (a), que están compuestas de una molécula de apolipoproteína (a) unida covalentemente a una molécula de apolipoproteína B, en hepatocitos humanos primarios tratados con oligonucleótidos antisentido dirigidos al componente apolipoproteína B de la lipoproteína (a).

25 Hepatocitos humanos primarios (InVitro Technologies, Baltimore, MD), cultivados y transfectados como se describe en la presente memoria, se trataron durante 24 h con 50 ó 150 nM de ISIS 271009 (SEQ ID NO: 319), 281625 (SEQ ID NO: 224), 301012 (SEQ ID NO: 247) o 301027 (SEQ ID NO: 262). Las células también se trataron con concentración 150 nM de los oligonucleótidos de control ISIS 113529 (SEQ ID NO: 859) o ISIS 13650 (SEQ ID NO: 806). Las células no tratadas sirvieron de control. Después de 24 h de tratamiento con el oligonucleótido, se midió la cantidad de lipoproteína (a) en el medio de cultivo recogido de las células tratadas, usando un kit de ELISA disponible en el comercio (ALerCHEK Inc., Portland, ME). Los resultados son la media de 3 experimentos y se expresan como el porcentaje de cambio en la secreción de lipoproteína (a) con respecto a los controles no tratados.

30 Los datos se muestran en la Tabla 39. Un "+" o "-" que preceden al número indica que la secreción de partículas de lipoproteína (a) aumentó o disminuyó, respectivamente, después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B.

35

Tabla 39

Inhibición de la secreción de partículas de lipoproteína (a) con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B						
	% de cambio en la secreción de lipoproteína (a)					
Dosis de oligonucleótido	n° de ISIS					
	271009	281625	301012	301027	13650	113529
50 nM	-25	-26	-27	-33	N.D.	N.D.
150 nM	-42	-24	-37	-44	+14	+14

Estos datos demuestran que la inhibición antisentido de la apolipoproteína B, un componente de la partícula de lipoproteína (a), puede reducir la secreción de lipoproteína (a) de hepatocitos humanos primarios. Además, esta reducción en la secreción de lipoproteína (a) no es necesariamente simultánea con una disminución de la expresión de ARNm de apolipoproteína (a), como se muestra en el ejemplo 57.

Ejemplo 59

Derivados con apareamientos erróneos y truncados de ISIS 301012

Como se demuestra en la presente memoria, ISIS 301012 (SEQ ID NO: 247) reduce los niveles de ARNm de la apolipoproteína B en líneas celulares humanas cultivadas igual que en los hepatocitos humanos primarios. En una realización adicional de la invención, se llevó a cabo un estudio usando derivados de la secuencia de nucleótidos de ISIS 301012. Se diseñó una serie de oligonucleótidos que contenían de 1 a 7 apareamientos erróneos de bases, empezando en el centro de la secuencia de ISIS 301012. Esta serie se diseñó para introducir la pérdida consecutiva de emparejamientos de bases de Watson-Crick entre ISIS 301012 y su secuencia diana de ARNm. Estos compuestos se muestran en la Tabla 40. Los compuestos antisentido con nucleótidos mal apareados con respecto a ISIS 301012 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que contiene diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido.

Se diseñó un derivado adicional de ISIS 301012 que comprendía la secuencia de ISIS 301012 con 2'-MOE-nucleótidos a lo largo del oligonucleótido (2'-MOE uniforme). Este compuesto tiene 20 nucleótidos de longitud, con enlaces fosforotioato a lo largo del oligonucleótido. Este compuesto también se muestra en la tabla 40.

Se trataron células HepG2 con los compuestos de la tabla 40 con 50 ó 150 nM, durante un periodo de 24 h, después de lo cual se aisló el ARN y se midió la expresión diana por PCR en tiempo real como se describe en la presente memoria. Células no tratadas sirvieron de control. Los resultados se muestran en la tabla 40 y están normalizados con respecto a las muestras de control.

Tabla 40

Efectos de los oligonucleótidos con apareamientos erróneos ISIS 301012 y un 2'MOE-oligonucleótido uniforme en la expresión de la apolipoproteína B en células HepG2					
			% de cambio en la expresión del ARNm de la apolipoproteína B		
n° de ISIS	SECUENCIA	n° de apareamientos erróneos	Dosis de oligonucleótido		SEQ ID NO DE LA DIANA
			50	150	
301012	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	0	-44	-75	247

Efectos de los oligonucleótidos con apareamientos erróneos ISIS 301012 y un 2'MOE-oligonucleótido uniforme en la expresión de la apolipoproteína B en células HepG2					
			% de cambio en la expresión del ARNm de la apolipoproteína B		
nº de ISIS	SECUENCIA	nº de apareamientos erróneos	Dosis de oligonucleótido		SEQ ID NO DE LA DIANA
			50	150	
Serie con apareamientos erróneos, oligonucleótidos quiméricos					
332770	GCCTCAGTCTTCTTCGCACC	1	+7	-22	864
332771	GCCTCAGTCTTATTCGCACC	2	+37	+37	865
332772	GCCTCAGTATTATTCGCACC	3	+99	+84	866
332773	GCCTCATTATTATTCGCACC	4	+75	+80	867
332774	GCCTCATTATTATTAGCACC	5	+62	+66	868
332775	GCCTCATTATTATTATCACC	6	-1	+10	869
332776	GCCTAATTATTATTATCACC	7	+10	+20	870
2'-MOE-oligonucleótido uniforme					
332769	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	0	-11	-14	247

Los resultados del tratamiento de células HepG2 con los compuestos de la tabla 40 ponen de manifiesto que ninguno de los compuestos presenta la inhibición dependiente de la dosis observada después de tratamiento con la secuencia de ISIS 301012 original. ISIS 332770, que tiene solo una sustitución de timidina a citosina en el centro del oligonucleótido, era 3 veces menos potente que ISIS 301012. Sustituciones de nucleótidos adicionales anulan la inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B.

Los oligonucleótidos fosforotioato quiméricos son metabolizados in vivo predominantemente por escisión endonucleolítica. Se diseñó una serie de oligonucleótidos por truncado de la secuencia de ISIS 301012 en incrementos de 1 ó 2 bases desde el extremo 5' y/o 3'. Los oligonucleótidos truncados representan los posibles productos que resultan de la escisión endonucleolítica. Estos compuestos se muestran en la Tabla 41. Los compuestos en la tabla 41 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de diferentes longitudes, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos extremos por 2'-metoxietil (2'-MOE)nucleótidos. La estructura exacta de cada oligonucleótido quimérico se designa en la tabla 41 como "estructura quimérica". Por ejemplo, una designación 4-10-4 indica que los primeros 4 (los más 5') y los últimos 4 (los más 3') son 2'-MOE-nucleótidos, y los 10 nucleótidos en el hueco son 2'-desoxinucleótidos. Los 2'-MOE-nucleótidos se indican en negrilla. Los enlaces internucleósidos (cadena principal) son fosfodiéster (P=O) entre nucleótidos resaltados; todos los demás enlaces internucleósidos son fosforotioato (P=S).

Se ensayó en estos compuestos su capacidad para reducir la expresión del ARNm de la apolipoproteína B. Se trataron células HepG2 con cada uno de los compuestos antisentido de la tabla 41, en concentración 10, 50 ó 150 nM, durante un periodo de 24 h, después de lo cual se aisló el ARN y se midió la expresión diana por PCR en tiempo real como se describe en la presente memoria. Células no tratadas sirvieron de control. Los resultados se muestran en la tabla 41 y están normalizados con respecto a las muestras de control no tratadas.

Tabla 41

Efecto de los mutantes truncados de ISIS 301012 en la expresión de la apolipoproteína B en células HepG2									
					% de cambio en la expresión del ARNm de la apolipoproteína B				
nº de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	Estructura quimérica	Dosis de oligonucleótido			SEQ ID NO DE LA DIANA	
					10	50	150		
301012	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	5~10~5	-51	-72	-92	247	
331022	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCAC	5~10~4	-33	-49	-87	871	
332777		3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCA	5~10~3	-27	-53	-80	872	
332778	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTC	5~10~0	-11	-20	-58	873	
332780	3	3248	CCTCAGTCTGCTTCGCAC	4~10~4	-3	-43	-74	874	
332781	3	3247	CTCAGTCTGCTTCGCA	3~10~3	-9	-35	-60	875	
332782	3	3246	TCAGTCTGCTTCGC	2~10~2	-16	-16	-69	876	
332784	3	3249	GCCTCAGTCT	5~5~0	+12	-1	+7	877	
332785	3	3238	GCTTCGCACC	0~5~5	+5	-2	-4	878	

Los resultados en la tabla 41 ilustran que la inhibición de la apolipoproteína B depende de la longitud de secuencia, así como de la complementariedad de secuencia y la dosis, como se demuestra en la tabla 41, pero las versiones truncadas de ISIS 301012 son capaces en cierta medida de inhibir la expresión del ARNm de la apolipoproteína B.

Ejemplo 60

Diseño y cribado de los ARNdc que se dirigen a la apolipoproteína B humana

Se diseñó una serie de dúplex de ácido nucleico que comprendían los compuestos antisentido de la presente descripción, y sus complementos para dirigirse a la apolipoproteína B y se muestran en la tabla 42. Todos los compuestos de la tabla 42 son oligorribonucleótidos de 20 nucleótidos de longitud con enlaces internucleósidos fosfodiéster (cadena principal) a lo largo del compuesto. Los compuestos se prepararon con extremos romos. La tabla 41 muestra la cadena antisentido de los ARNdc, y la cadena del mismo sentido se sintetiza como complemento de la cadena antisentido. Se muestra que estas secuencias contienen uracilo (U) pero un experto en la técnica apreciará que el uracilo (U) generalmente es sustituido por timina (T) en las secuencias de ADN. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el compuesto. Un subconjunto de los compuestos en la tabla 42 son los equivalentes de ARN de los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente memoria, y cuando se aplique, esto se indica por el n° de ISIS del oligonucleótido de ADN en la columna de "ARN equivalente a n° de ISIS"

Tabla 42

ARNdc dirigidos a la apolipoproteína B humana						
n° de ISIS	Región	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	Secuencia	SEQ ID NO DE LA DIANA	ARN equivalente a n° de ISIS
342855	codificante	3	3249	GCCUCAGUCUGCUUCGCACC	247	301012
342856	3' UTR	3	13903	GCUCACUGUAUGGUUUUAUC	262	301027
342857	codificante	3	5589	AGGUUACCAGCCACAUGCAG	224	308361
342858	codificante	3	669	GAGCAGUUUCCAUACACGGU	130	270991
342859	codificante	3	1179	CCUCUCAGCUCAGUAACCAG	135	270996
342860	codificante	3	2331	GUAUAGCCAAAGUGGUCCAC	34	147797
342861	codificante	3	3579	UAAGCUGUAGCAGAUGAGUC	213	281614
342862	5' UTR	3	6	CAGCCCCGCAGGUCCCGGUG	249	301014
342863	5' UTR	3	116	GGUCCAUCGCCAGCUGCGGU	256	301021
342864	3' UTR	3	13910	AAGGCUGGCUCACUGUAUGG	266	301031
342865	3' UTR	3	13970	GCCAGCUUUGGUGCAGGUCC	273	301038
342866	codificante	3	426	UUGAAGCCAUACACCUCUUU	879	Ninguno
342867	codificante	3	3001	UGACCAGGACUGCCUGUUCU	880	Ninguno
342868	codificante	3	5484	GAAUAGGGCUGUAGCUGUAA	881	Ninguno
342869	codificante	3	6662	UAUACUGAUCAAUUGUAUC	882	Ninguno
342870	codificante	3	8334	UGGAAUUCUGGUAUGUGAAG	883	Ninguno
342871	codificante	3	9621	AAAUCAAAUGAUUGCUUUGU	883	Ninguno
342872	codificante	3	10155	GUGAUGACACUUGAUUUUAAA	885	Ninguno
342873	codificante	3	12300	GAAGCUGCCUCUUCUCCCA	886	Ninguno
342874	codificante	3	13629	GAGAGUUGGUCUGAAAAAUC	887	Ninguno

Se ensayaron los efectos de los ARNdc de la tabla 42 en el ARNm de la apolipoproteína humana en células HepG2. Las células HepG2 se trataron con compuestos de ARNdc 100 nM mezclados con LIPOFECTIN 5 µg/ml (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) durante un periodo de 16 h. En el mismo experimento, las células HepG2 también se trataron con un subconjunto de oligonucleótidos antisentido 150 nM descritos en la presente memoria mezclados con LIPOFECTIN 3,75 µg/ml; estos compuestos se indican en la Tabla 43. Los oligonucleótidos de control incluían ISIS 18078 (GTGCGCGCGAGCCCGAAATC, SEQ ID NO: 888). ISIS 18078 es un oligonucleótido quimérico ("gámpero") de 20 nucleótidos de longitud, compuesto de una región de "hueco" central que consiste en 9 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en los extremos 5' y 3' por un "ala" de 5 nucleótidos y un "ala" de 6

nucleótidos, respectivamente. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todas las citidinas son 5-metilcitidinas. El dúplex de ISIS 263188 (CUUCUGGCAUCCGGUUUAGTT, SEQ ID NO: 889) y su complementario también se usan como control. ISIS 263188 es un oligorribonucleótido de 21 nucleótidos de longitud siendo los 2 nucleótidos del extremo 3'-oligodesoxirribonucleótidos (TT) y con enlaces internucleósido fosfodiéster (cadena principal) a lo largo del compuesto.

Las células se trataron durante 4 h, después de lo cual se midió la expresión del ARNm de la apolipoproteína B humana como se describe en los ejemplos en la presente memoria. Los resultados se normalizaron con respecto a las células de control no tratadas, las cuales no se trataron con LIPOFECTIN u oligonucleótido. Los datos son la media de 4 experimentos y se presentan en la tabla 43.

Tabla 43

Inhibición del ARNm de la apolipoproteína B por los ARNdc en células HepG2			
nº de ISIS	Dosis	% inhibición	SEQ ID No
342855	100 nM	53	247
342856	100 nM	34	262
342857	100 nM	55	224
342858	100 nM	44	130
342859	100 nM	23	135
342860	100 nM	34	34
342861	100 nM	42	213
342862	100 nM	16	249
342863	100 nM	34	256
342864	100 nM	53	266
342865	100 nM	50	273
342866	100 nM	12	879
342867	100 nM	26	880
342868	100 nM	36	881
342869	100 nM	78	882
342870	100 nM	71	883
342871	100 nM	9	883
342872	100 nM	2	885
342873	100 nM	53	886
342874	100 nM	73	887

Inhibición del ARNm de la apolipoproteína B por los ARNdc en células HepG2			
nº de ISIS	Dosis	% inhibición	SEQ ID No
281625	150 nM	79	224
301012	150 nM	77	247
301014	150 nM	88	249
301021	150 nM	67	256
301027	150 nM	79	262
301028	150 nM	85	263
301029	150 nM	77	264
301030	150 nM	70	265
301031	150 nM	73	266
301037	150 nM	80	272
301038	150 nM	84	273
301045	150 nM	77	280
263188	150 nM	26	888
18078	150 nM	13	889

Ejemplo 61

Inhibición antisentido de la apolipoproteína B en hepatocitos primarios de macaco cangrejero

5 Como se demostró en el ejemplo 46, la región que contiene el sitio diana con el que hibrida ISIS 301012 comparte una identidad de 96% con la correspondiente región de la secuencia de ARNm de la apolipoproteína B del macaco cangrejero. ISIS 301012 contiene dos nucleótidos mal apareados con respecto a la secuencia de ARNm de la apolipoproteína B del macaco cangrejero con la que hibrida. En un aspecto adicional de la descripción, se diseñaron oligonucleótidos para dirigirse al ARNm de la apolipoproteína B de mono, usando la secuencia parcial de la apolipoproteína B del macaco cangrejero descrita en la presente memoria (SEQ ID NO: 855) y una parte adicional de la secuencia de ARN de la apolipoproteína B de macaco cangrejero, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 890. El sitio diana indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular a la que se une el oligonucleótido. Para ISIS 326358 (GCCTCAGTCTGCTTTACACC, SEQ ID NO: 891) el sitio diana es el nucleótido 168 de la SEQ ID NO: 855 y para ISIS 315089 (AGATTACCAGCCATATGCAG, SEQ ID NO: 892) el sitio diana es el nucleótido 19 de la SEQ ID NO: 890. ISIS 326358 e ISIS 315089 son oligonucleótidos quiméricos ("gámperos") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. ISIS 326358 e ISIS 315089 son los equivalentes del macaco cangrejero de los oligonucleótidos antisentido para la apolipoproteína B humana ISIS 301012 (SEQ ID NO: 247) e ISIS 281625 (SEQ ID NO: 224), respectivamente.

Se comparó la inhibición antisentido de ISIS 301012 con la de ISIS 326358, que tiene una correspondencia perfecta con la secuencia de la apolipoproteína B del macaco cangrejero con la que hibrida ISIS 301012. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B del macaco cangrejero en hepatocitos primarios de macaco cangrejero adquiridos in Vitro Technologies (Gaithersburg, MD). Los hepatocitos primarios de macaco

cangrejero precultivados en placa se adquirieron en InVitro Technologies (Baltimore, MD). Las células se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), 100 unidades/ml y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

- 5 Los hepatocitos primarios de macaco cangrejero se trataron con oligonucleótidos antisentido 10, 50, 150 ó 300 nM durante 48 h. ISIS 113529 (SEQ ID NO: 859) se usó como un oligonucleótido de control. Las células no tratadas también sirvieron de control. Los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de macaco cangrejero se cuantificaron por PCR en tiempo real usando los cebadores de la apolipoproteína B humana y GAPDH y las sondas descritas en los ejemplos en la presente memoria. Los resultados, mostrados en la tabla 44, son la media de 6 experimentos y se expresan como porcentaje de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B normalizados con respecto a las células de control no tratadas.

Tabla 44

Inhibición del ARNm de la apolipoproteína B del macaco cangrejero por ISIS 301012 e ISIS 326358				
		% de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B		
		nº de ISIS		
Dosis de oligonucleótido	Tiempo de tratamiento (horas)	326358	301012	113529
10 nM	24	35	24	N.D.
	48	85	76	N.D.
50 nM	24	66	60	N.D.
	48	88	77	N.D.
150 nM	24	61	56	5
	48	82	88	42
300 nM	24	64	61	19
	48	87	86	13

- 15 Estos datos demuestran que tanto ISIS 326359 como ISIS 301012 (a pesar de dos apareamientos erróneos con la secuencia de la apolipoproteína B del macaco cangrejero) pueden inhibir la expresión del ARNm de la apolipoproteína B en hepatocitos primarios de macaco cangrejero, de una forma dependiente de la dosis y del tiempo.

- 20 Se midió la proteína apolipoproteína B secretada por hepatocitos primarios de macaco cangrejero tratados con oligonucleótido 150 y 300 nM por ELISA, usando un kit específico de proteína apolipoproteína B (ALerCHEK Inc., Portland, ME). Cada resultado representa la media de 3 experimentos. Los datos se normalizan respecto a las células de control no tratadas y se muestran en la tabla 45.

Tabla 45

Reducción de la proteína apolipoproteína B secretada por hepatocitos de macaco cangrejero después de tratamiento con oligonucleótido antisentido				
		% de reducción de la proteína apolipoproteína B secretada		
		n° de ISIS		
Dosis de oligonucleótido	Tiempo de tratamiento (horas)	326358	301012	113529
150 nM	24	21	31	11
	48	29	25	18
300 nM	24	17	10	12
	48	35	17	8

Estos resultados demuestran que la inhibición antisentido por ISIS 301012 e ISIS 326358 conduce a una disminución de la secreción de la proteína apolipoproteína B de hepatocitos de macaco cangrejero primarios cultivados.

Además, la proteína se aisló de los hepatocitos de macaco cangrejero primarios tratados con oligonucleótido y se sometieron a análisis de inmunotransferencia para evaluar mejor la expresión de la proteína apolipoproteína B. La inmunotransferencia se realizó como se describe en la presente memoria, usando un anticuerpo contra la proteína apolipoproteína B humana (US Biologicals, Swampscott, MA). El análisis de inmunotransferencia de la expresión de la apolipoproteína B después del tratamiento con oligonucleótido antisentido con ISIS 326358 e ISIS 301012 pone de manifiesto una reducción sustancial de la expresión de la apolipoproteína B.

En un aspecto adicional de la descripción, se comparó la inhibición antisentido por ISIS 281625 con la de ISIS 315089, que es una correspondencia perfecta con la secuencia de la apolipoproteína B del macaco cangrejero con la que hibrida ISIS 281625. Hepatocitos primarios de macaco cangrejero, cultivados como se describe en la presente memoria, se trataron con ISIS 315089 o ISIS 281625, 10, 50, 150 ó 300 nM durante 24 h. Las células se trataron con el oligonucleótido de control ISIS 13650 (SEQ ID NO: 806) 150 y 300 nM o con ISIS 113529 (SEQ ID NO: 859) 300 nM. Las células no tratadas también sirvieron de control. Se cuantificaron los niveles de ARNm de la apolipoproteína B en los hepatocitos primarios de macaco cangrejero usando la PCR en tiempo real con cebadores y sonda humanos como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los resultados, mostrados en la tabla 46, son la media de 3 experimentos y se expresan como porcentaje de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B normalizados con respecto a las células de control no tratadas. Cuando está presente, un "+" que precede al valor indica que aumentó la expresión de ARNm.

Tabla 46

Inhibición antisentido de la expresión del ARNm de la apolipoproteína B en hepatocitos de macaco cangrejero				
	% de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B			
	n° de ISIS			
Dosis de oligonucleótido	315089	281625	13650	113529
10 nM	70	+5	N.D.	N.D.
50 nM	83	41	N.D.	N.D.
150 nM	81	35	+50	N.D.

Inhibición antisentido de la expresión del ARNm de la apolipoproteína B en hepatocitos de macaco cangrejero				
	% de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B			
	n° de ISIS			
Dosis de oligonucleótido	315089	281625	13650	113529
300 nM	82	69	33	28

Estos datos demuestran que tanto ISIS 315089 como ISIS 281625 pueden inhibir la expresión del ARNm de la apolipoproteína B en hepatocitos primarios de macaco cangrejero, de una forma dependiente de la dosis.

- 5 Se midió la proteína apolipoproteína B secretada por hepatocitos primarios de macaco cangrejero tratados con ISIS 315089 e ISIS 281625, 50 y 150 nM, por ELISA usando un kit específico de la proteína apolipoproteína B (ALerCHEK Inc., Portland, ME). Cada resultado representa la media de 3 experimentos. Los datos se normalizan respecto a las células de control no tratadas y se muestran en la tabla 47.

Tabla 47

Reducción de la proteína apolipoproteína B secretada por hepatocitos de macaco cangrejero después de tratamiento con oligonucleótido antisentido				
	% de reducción de la secreción de proteína apolipoproteína B de mono			
	n° de ISIS			
Dosis de oligonucleótido	315089	281625	13650	113529
50 nM	11	6	16	N.D.
150 nM	25	13	13	12

- 10 Estos resultados demuestran que la inhibición antisentido por ISIS 315089 150 mM conduce a una disminución de la secreción de la proteína apolipoproteína B de hepatocitos de macaco cangrejero primarios cultivados.

- 15 También se ensayaron los efectos de ISIS 271009 (SEQ ID NO: 319) e ISIS 301027 (SEQ ID NO: 262) en el ARNm de la apolipoproteína B y expresión de proteína en hepatocitos primarios de macaco cangrejero. Las células cultivadas como se describe en la presente memoria, se trataron con ISIS 271009 o ISIS 301027, 10, 50 y 150 nM durante 24 h. Las células se trataron con el oligonucleótido de control ISIS 113529 (SEQ ID NO: 859) 150 nM. Las células no tratadas también sirvieron de control. Se cuantificaron los niveles de ARNm de la apolipoproteína B en los hepatocitos primarios de macaco cangrejero usando la PCR en tiempo real con cebadores y sonda humanos como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los resultados, mostrados en la tabla 48, son la media de 2 experimentos y se expresan como porcentaje de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B normalizados con respecto a las células de control no tratadas.
- 20

Tabla 48

Inhibición antisentido de la expresión del ARNm de la apolipoproteína B en hepatocitos de macaco cangrejero			
	Inhibición del ARNm de la apolipoproteína B		
	n° de ISIS		
Dosis de oligonucleótido	271009	301027	113529
10 nM	42	40	N.D.
50 nM	66	54	N.D.
150 nM	69	67	11

Estos datos demuestran que tanto ISIS 271009 como ISIS 301027 pueden inhibir la expresión del ARNm de la apolipoproteína B en hepatocitos primarios de macaco cangrejero, de una forma dependiente de la dosis.

- 5 Se midió la proteína apolipoproteína B secretada por hepatocitos primarios de macaco cangrejero tratados con ISIS 271009 e ISIS 301027, 50 y 150 nM, por ELISA usando un kit específico de la proteína apolipoproteína B (ALerCHEK Inc., Portland, ME). Cada resultado representa la media de 3 experimentos. Los datos se muestran como porcentaje de reducción de la proteína secretada, normalizados con respecto a las células de control no tratadas y se muestran en la tabla 49. Cuando está presente, un "+" indica que la secreción de proteína era mayor.

10 Tabla 49

Reducción de la proteína apolipoproteína B secretada por hepatocitos de macaco cangrejero después de tratamiento con oligonucleótido antisentido				
	% de reducción de la secreción de proteína apolipoproteína B de mono			
	n° de ISIS			
Dosis de oligonucleótido	271009	301027	13650	113529
50 nM	+30	25	N.D.	N.D.
150 nM	26	31	+1	15

Estos resultados demuestran que la inhibición antisentido por ISIS 315089 e ISIS 281625 conduce a una disminución de la secreción de la proteína apolipoproteína B de hepatocitos de macaco cangrejero primarios cultivados.

15 Ejemplo 62

Métodos para evaluar la esteatosis hepática

La esteatosis hepática se refiere a la acumulación de lípidos en el hígado o "hígado graso", que es producida con frecuencia por el consumo de alcohol, diabetes e hiperlipidemia. Se evaluó en los hígados de animales tratados con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B la presencia de esteatosis. La esteatosis se evalúa por análisis histológico de tejido hepático y medida de los niveles de triglicéridos en el hígado.

- 20 El tejido reseccionado del hígado se sumerge inmediatamente en compuesto de inmersión Tissue Tek OCT (Ted Pella, Inc., Redding, CA) y se congela en una suspensión de hielo seco de 2-metil-butano. Las secciones de tejido se cortan con un grosor de 4-5 μ m y después se fijan en formalina tamponada neutra al 5%. Las secciones de tejido se tiñen con hematoxilina y eosina siguiendo procedimientos histológicos estándar para visualizar los núcleos y

citoplasma, respectivamente, y rojo oleoso O de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Newcomers Supply, Middleton, WI) para visualizar los lípidos.

Alternativamente, los tejidos se fijan en formalina tamponada neutra al 10%, se sumergen en parafina, se cortan en secciones de 4-5 µm de grosor, se desparafinan y se tiñen con hematoxilina y eosina, todo de acuerdo con procedimientos histológicos estándar.

También se usa la cuantificación del contenido de triglicéridos para evaluar la estosis. Los niveles de triglicéridos en los tejidos se miden usando un ensayo GPO de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Ejemplo 63

Efectos de la inhibición antisentido por ISIS 301012 en ratones magros: estudio a largo plazo

La toxicidad de ISIS 301012 (SEQ ID NO: 247) se investiga en un estudio de 3 meses, a largo plazo, en ratones. Se administra a ratones CD-1 macho y hembra, de 2 meses de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) 2, 5, 12,5, 25 ó 50 mg/kg de ISIS 301012 dos veces por semana durante la primera semana, y después cada 4 días. Los ratones se mantienen con una dieta de roedores estándar. Los animales con disolución salina u oligonucleótido de control sirven como controles y las inyecciones siguen el mismo esquema. Cada grupo de tratamiento contiene de 6 a 10 ratones de cada sexo, y cada grupo de tratamiento está por duplicado, un grupo para terminar el estudio en 1 mes, el otro para terminar el estudio en 3 meses. Después de los periodos de tratamiento de 1 ó 3 meses, los ratones son sacrificados y se evalúa la expresión de la diana en el hígado, los niveles de lípidos en el suero y los indicadores de toxicidad. Se obtienen muestras de hígado, se aísla el ARN y se mide la expresión del ARNm de la apolipoproteína B por la PCR en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los lípidos en el suero, incluyendo el colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos se evaluaron mediante análisis clínicos rutinarios usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY). También se calcularon las relaciones de colesterol LDL a colesterol HDL y de colesterol total a colesterol HDL. El análisis de ALT y AST en el suero, infiltrados inflamatorios en el tejido y gránulos basófilos en el tejido proporcionan una evaluación de las toxicidades relacionadas con el tratamiento. La esteatosis hepática, o acumulación de lípidos en el hígado, se evalúa mediante análisis histológicos de rutina con tinción con rojo oleoso O y la medición de triglicéridos en el tejido hepático, usando un ensayo GPO de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

El estudio de toxicidad también incluye grupos de animales que se dejan recuperar tras cesar el tratamiento con oligonucleótido. Se tratan ratones CD-1 tanto machos como hembras (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) con 5, 10, 50 mg/kg de ISIS 301012 dos veces por semana durante la primera semana y después cada 4 días. Los animales a los que se inyectó disolución salina y oligonucleótido de control sirven como controles. Cada grupo de tratamiento incluye 6 animales por sexo. Después de 3 meses de tratamiento, los animales permanecen sin tratamiento durante 3 meses adicionales, después de los cuales se sacrifican. Se evalúan los mismos parámetros que en los ratones sacrificados inmediatamente después de 3 meses de tratamiento.

Después de 1 mes de tratamiento, la cuantificación por PCR en tiempo real pone de manifiesto que los niveles de ARNm de la apolipoproteína B en el hígado se reducen en 53%. Además, se observaron las toxicidades de dosis-respuesta esperadas. Los niveles de ALT y AST, medidos por procedimientos clínicos rutinarios en un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY), son mayores en ratones tratados con 25 ó 50 mg/kg de ISIS 301012. Los tejidos se prepararon para el análisis por procedimientos histológicos rutinarios. Se observaron gránulos basófilos en el hígado y tejido de riñón con dosis de ISIS 301012 superiores a 12,5 mg/kg. Se observaron infiltrados linfocitarios en diferentes tejidos con dosis mayores de 12,5 mg/kg de ISIS 301012. La tinción de las secciones de tejido con rojo oleoso O pone de manifiesto que no hay estosis después de los tratamientos con oligonucleótido.

Ejemplo 64

Efectos de la inhibición antisentido por ISIS 301012 en macacos cangrejeros magros: estudio a largo plazo

Como se describe en el ejemplo 45, se usan macacos cangrejeros (machos o hembras) para evaluar el potencial de los oligonucleótidos antisentido para reducir los niveles de proteína o ARNm de la apolipoproteína B, así como criterios de valoración fenotípicos asociados con la apolipoproteína B incluyendo, pero sin limitar, indicadores cardiovasculares, aterosclerosis, enfermedades lipídicas, obesidad y formación de placa. Por consiguiente, en una realización adicional de la invención, se investigan los efectos de ISIS 301012 (SEQ ID NO: 247) en un estudio a largo plazo en la expresión de la apolipoproteína B y los lípidos en el suero en macacos cangrejeros. Dicho estudio a largo plazo también se usa para evaluar la toxicidad de los compuestos antisentido.

Se tratan macacos cangrejeros machos y hembra con 2, 4 ó 12 mg/kg de ISIS 301012 por vía intravenosa, o con 2 ó 20 mg/kg por vía subcutánea con una frecuencia de cada dos días la primera semana, y después cada 4 días, durante periodos de 1 y 3 meses de tratamiento. Los animales tratados con disolución salina sirven como controles. Cada grupo de tratamiento incluye de 2 a 3 animales de cada sexo.

Con un intervalo de un mes y a los 3 meses de la terminación del estudio, se sacrifican los animales y se evalúa la expresión de la diana en el hígado, los niveles de lípidos en suero y los indicadores de toxicidad. Se obtienen muestras de hígado, se aísla el ARN y se mide la expresión del ARNm de la apolipoproteína B por la PCR en tiempo real como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los lípidos en el suero, incluyendo el colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos se evaluaron mediante análisis clínicos rutinarios usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY). También se calcularon las relaciones de colesterol LDL a colesterol HDL y de colesterol total a colesterol HDL. El análisis de ALT y AST en el suero, infiltrados inflamatorios en el tejido y gránulos basófilos en el tejido proporcionan una evaluación de las toxicidades relacionadas con el tratamiento. La esteatosis hepática, o acumulación de lípidos en el hígado, se evalúa mediante análisis histológicos de rutina con tinción con rojo oleoso O y la medición de triglicéridos en el tejido hepático, usando un ensayo GPO de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Los grupos de tratamiento adicionales, consistían en 2 animales por sexo, que se tratan con disolución salina (0 mg/kg), 12 ó 20 mg/kg de ISIS 301012 con una frecuencia de cada dos días durante la primera semana, y después cada 4 días, durante un periodo de 3 meses. Después del periodo de tratamiento, los animales no reciben tratamiento durante 3 meses adicionales. Estos grupos de tratamiento están dirigidos al estudio de los efectos de la inhibición de la apolipoproteína B 3 meses después de cesar el tratamiento. Al final del periodo de recuperación de 3 meses, los animales se sacrifican y se evalúan los mismos parámetros que en los animales sacrificados inmediatamente después de 1 y 3 meses de tratamiento.

Los resultados procedentes del intervalo de un mes del tratamiento a largo plazo, se muestran en la Tabla 50 y están normalizados con respecto a animales tratados con disolución salina, para el ARNm y respecto a los valores de referencia no tratados, para los niveles de lípidos. Los niveles en suero de colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, concentración de partículas de LDL y triglicéridos se midieron por espectroscopia de resonancia magnética nuclear mediante Liposcience (Raleigh, NC). Además, la concentración de oligonucleótido intacto en el hígado se midió mediante electroforesis en gel capilar y se presenta como microgramos de oligonucleótido por gramo de tejido hepático. Cada resultado representa el promedio de los datos de 4 animales (2 machos y 2 hembras).

Tabla 50

Efectos de la inhibición antisentido por ISIS 301012 en macacos cangrejeros magros:						
		Administración intravenosa			Inyección subcutánea	
		2 mg/kg	4 mg/kg	12 mg/kg	3,5 mg/kg	20 mg/kg
% de cambio de la expresión de la apolipoproteína B normalizado respecto a la disolución salina		-45	-76	-96	N.D.	-94
Concentración del oligonucleótido antisentido µg/g		92	179	550	N.D.	855
Parámetros lipídicos, % de cambio normalizado frente al valor de referencia no tratado	Disolución salina	2 mg/kg	4 mg/kg	12 mg/kg	3,5 mg/kg	20 mg/kg
Colesterol total	+1	-6	-2	-2	+5	-5
Colesterol LDL	+17	+15	+9	+3	-4	-16
Colesterol HDL	-11	-23	-15	-8	+13	+5
LDL/HDL	+62	+94	+38	+44	-15	-19

Efectos de la inhibición antisentido por ISIS 301012 en macacos cangrejeros magros:						
		Administración intravenosa			Inyección subcutánea	
		2 mg/kg	4 mg/kg	12 mg/kg	3,5 mg/kg	20 mg/kg
Colesterol total/HDL	+30	+44	+22	+21	-7	-10
Triglicérido	+37	+26	+32	+15	+1	-3
Concentración de partículas de LDL	+15	+8	+8	-11	-14	-21

Estos datos muestran que ISIS 301012 inhibe la expresión de la apolipoproteína B de una manera dependiente de la dosis en una especie de primates y de forma concomitante disminuye los niveles de lípidos con dosis más altas de ISIS 301012. Además, estos resultados demuestran que el oligonucleótido antisentido se acumula en el hígado de una forma dependiente de la dosis.

No se observó esteatosis hepática, o acumulación de lípidos en el hígado, después de 4 semanas de tratamiento con las dosis indicadas. Se observó una toxicidad esperada relacionada con la dosis, con las dosis más altas de 12 y 20 mg/kg, incluyendo un incremento transitorio de 1,2-1,3 veces en el tiempo de la tromboplastina parcial activada (APTT), durante las primeras 4 horas y gránulos basófilos en el hígado y el riñón (tal y como se determinó con un examen histológico de rutina con muestras de tejidos). No se observaron cambios funcionales en el riñón.

En un experimento similar, monos cangrejeros machos y hembras recibieron una dosis intravenosa de ISIS 301012 de 4 mg/kg, cada dos días durante la primera semana y después cada 4 días. Los grupos de animales se sacrificaron después de la primera dosis y la cuarta dosis, así como los días 11, 15 y 23 después de la cuarta dosis y la dosis final. Se aisló el ARN del hígado y se evaluaron los niveles de ARNm de la apolipoproteína B por PCR en tiempo real como se describe en la presente memoria. Los resultados de este experimento demuestran una reducción del 40% en la expresión del ARNm de la apolipoproteína B después de una dosis intravenosa única de 4 mg/kg de ISIS 301012. Además, después de 4 dosis de ISIS 301012 de 4 mg/kg, el ARNm diana se redujo en aproximadamente 85% y se mantuvo una reducción del 50% en el ARNm diana hasta 16 días después del cese del tratamiento con el oligonucleótido antisentido.

Ejemplo 65

Análisis de micromatrices: patrones de expresión génica en ratones magros frente a ratones alimentados con alto contenido de grasa

Ratones C57B1/6 se dividieron en los siguientes grupos, que consistían en 5 animales cada uno: (1) ratones con dieta magra, a los que se inyecta disolución salina (control magros); (2) ratones con una dieta con alto contenido en grasa; (3) ratones con una dieta con alto contenido en grasa a los que se inyectan 50 mg/kg del oligonucleótido de control 141923 (SEQ ID NO: 858); (4) ratones con una dieta con alto contenido en grasa a los que se les dan 20 mg/kg de atorvastatina de calcio (Lipitor®, Pfizer Inc.); (5) ratones con una dieta con alto contenido en grasa a los que se inyectan 10, 25 ó 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID NO: 109). Los tratamientos con disolución salina y oligonucleótido se administraron por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 6 semanas. La atorvastatina se administró diariamente durante 6 semanas. Al terminar el estudio, se aislaron muestras de hígado de cada animal y se aisló el ARN para la evaluación cualitativa por transferencia Northern, micromatriz de ADN y PCR en tiempo real cuantitativa. La evaluación por transferencia Northern y la PCR en tiempo real cuantitativa se realizaron como se describe en otros ejemplos en la presente memoria.

Para el análisis de micromatrices de ADN, se prepararon muestras de hibridación a partir de 10 µg de ARN total aislado de cada hígado de ratón de acuerdo con el manual técnico de análisis de expresión de Affymetrix (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Las muestras se hibridaron con un chip de genes de ratón que contenía aproximadamente 22.000 genes, que posteriormente se lavó, se tiñó doblemente usando Fluidics Station 400 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) como define el protocolo del fabricante. Se hizo un barrido de los chips teñidos de la intensidad celular de la sonda con el escáner GeneArray (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Se calcularon los valores de las señales de cada conjunto de sondas usando el software de Affymetrix Microarray Suite v5.0 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Se hizo el perfil de cada condición a partir de 5 muestras biológicas por grupo, un chip por muestra. El número de cambios de la expresión se computó usando la media geométrica de los valores de la señal Microarray Suite v5.0. El análisis estadístico usaba ANOVA de una vía seguido de 9 comparaciones por parejas. Todos los grupos se compararon con el grupo de alto contenido de grasa para determinar los cambios en la

expresión génica que resultan del tratamiento con ISIS 147764. Los datos de las micromatrices se interpretaron usando una agrupación jerárquica para visualizar los patrones de expresión génica globales.

Los resultados de los análisis de micromatrices pusieron de manifiesto que el tratamiento con ISIS 147764 lleva el perfil de expresión génica en los ratones alimentados con alto contenido en grasa al perfil observado en los ratones magros. El análisis por PCR en tiempo real confirmó la reducción de la expresión del ARNm para los siguientes genes implicados en el metabolismo de lípidos: lipasa hepática, casete de unión a ATP sintasa de ácidos grasos, miembro 2 de la subfamilia D (ALD), proteína de unión a ácidos grasos intestinales 2, estearoil-CoA desaturasa-1 y HMG CoA reductasa.

Se evaluaron los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de ratón y de colesterol en el suero como se describe en la presente memoria, para confirmar la inhibición antisentido por ISIS 147764 e ISIS 147483. Tanto los niveles de ARNm como los de colesterol disminuyeron de una forma dependiente de la dosis después de tratamiento con ISIS 147764 o ISIS 147483, como se demuestra en otros ejemplos en la presente memoria. La dosis de 50 mg/kg de ISIS 147483 aumentó los niveles de ALT y AST. Las dosis de 10, 25 y 50 mg/kg de ISIS 147764 y las dosis de 10 y 25 mg/kg de ISIS 147483 no elevaron significativamente los niveles de ALT o AST.

Ejemplo 66

Evaluación de la esteatosis hepática en animales tratados con oligonucleótidos antisentido de la apolipoproteína B

Se evaluó en los hígados de animales tratados con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B la presencia de esteatosis. La esteatosis se evalúa por análisis histológico de tejido hepático y medida de los niveles de triglicéridos en el hígado.

Evaluación de la esteatosis en animales alimentados con alto contenido en grasa, tratados con ISIS 147764 durante 6 semanas

Se evaluó en el tejido hepático de animales tratados con ISIS 147764 (SEQ ID NO: 109) y de control descritos en el ejemplo 21, la esteatosis al terminar el estudio después de 6 semanas de tratamiento. Se tiñeron secciones de tejido con rojo oleoso O y hematoxilina para visualizar los lípidos y núcleos respectivamente. También se tiñeron secciones de tejidos con hematoxilina y eosina para visualizar los núcleos y el citoplasma, respectivamente. El análisis histológico de secciones de tejidos teñidas por cualquiera de los métodos puso de manifiesto que no había diferencia en la esteatosis entre los animales tratados con disolución salina y los tratados con ISIS 147764, demostrando que un tratamiento de 6 semanas con ISIS 147764 no conduce a la acumulación de lípidos en el hígado.

Evaluación de la esteatosis después de tratamiento a largo plazo con inhibidor de la apolipoproteína B en animales alimentados con alto contenido en grasa

Se trataron ratones macho C57B1/6 dos veces por semana con inyecciones intraperitoneales de 25 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID NO: 109) o 25 mg/kg de ISIS 141923 (SEQ ID NO: 858) durante 6, 12 y 20 semanas. Los animales tratados con disolución salina sirvieron como controles. Cada grupo de tratamiento contenía 4 animales. Los animales se sacrificaron a las 6, 12 y 20 semanas y se obtuvo tejido hepático para el análisis histológico y la medición del contenido de triglicéridos en el tejido. Los resultados pusieron de manifiesto que no había diferencias significativas en el contenido de triglicéridos del tejido hepático cuando se comparan los animales tratados con ISIS 147764 con los animales tratados con disolución salina. Además, los análisis histológicos de la sección de tejido hepático demuestran que la esteatosis se reduce a las 12 y 20 semanas después de tratamiento de los ratones alimentados con alto contenido en grasa, con ISIS 147764, en comparación con los animales de control de disolución salina que recibieron una dieta con alto contenido en grasa.

Evaluación de la esteatosis en ratones magros

También se evaluó la acumulación de lípidos en el tejido hepático en ratones magros. Ratones macho C67B1/6 (Charles River Laboratories (Wilmington, MA) de 6 a 7 semanas de edad, se mantuvieron con una dieta de roedor estándar y se trataron dos veces por semana con inyecciones intraperitoneales de 25 ó 50 mg/kg de 147764 (SEQ ID NO: 109) o 147483 (SEQ ID NO: 79) durante 6 semanas. Los animales tratados con disolución salina sirvieron como controles. Cada grupo de tratamiento estaba compuesto de 4 animales. Los animales se sacrificaron después del periodo de tratamiento de 6 semanas, momento en el que se recogieron el tejido hepático y el suero.

Se midieron los niveles de ARNm de la apolipoproteína B por PCR en tiempo real, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos mostrados en la tabla 51, representan la media de 4 animales y se presentan como la inhibición con respecto a los controles tratados con disolución salina. Los resultados demuestran que tanto ISIS 147483 como ISIS 147764 inhiben la expresión del ARNm de la apolipoproteína B en ratones magros, de una forma dependiente de la dosis.

Tabla 51

Inhibición antisentido de ARNm de la apolipoproteína B en ratones magros				
	Tratamiento y dosis			
	ISIS 147483		ISIS 147764	
	25 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
% de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B	79	91	48	77

5 El colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos en el suero se midieron por análisis clínico rutinario usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY). Las enzimas hepáticas ALT y ALT en el suero también se midieron usando el analizador clínico Olympus. Estos resultados demuestran que ISIS 147764 disminuye los lípidos en el suero con respecto a los animales de control tratados con disolución salina. Los niveles de ALT y AST no superan el intervalo normal para ratones (300 IU/l), indicando falta de toxicidad asociada al tratamiento. Los resultados son la media de los datos de 4 animales y se muestran en la tabla 52.

Tabla 52

Niveles de lípidos y enzimas hepáticas en el suero en ratones magros tratados con ISIS 147764 e ISIS 147483					
	Tratamiento y dosis				
	Disolución salina	ISIS 147483		ISIS 147764	
		25 mg/kg	50 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
Lípidos en el suero					
Colesterol total mg/dl	164	153	183	114	57
Colesterol LDL mg/dl	25	26	39	29	18
Colesterol HDL mg/dl	127	117	131	79	38
Triglicéridos mg/dl	121	138	127	80	30
Enzimas hepáticas					
ALT IU/l		105	73	57	47
AST IU/l		109	78	72	81

10 Se preparó tejido hepático por métodos histológicos rutinarios para evaluar la estosis, como se describe en la presente memoria. El examen de muestras de tejido teñidas con rojo oleoso O o hematoxilina y eosina, pone de manifiesto que el tratamiento de ratones magros con oligonucleótidos antisentido para apolipoproteína B no produce estosis.

15 Estudio de 6 meses para evaluar mejor la estosis en ratones tratados con oligonucleótidos antisentido para la apolipoproteína B

Se usa un tratamiento a largo plazo de ratones con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B para evaluar los efectos tóxicos y farmacológicos del tratamiento prolongado con compuestos antisentido. Se tratan ratones C57B1/6 tanto machos como hembras a los 2 meses de edad con 2, 5, 25 ó 50 mg/kg de oligonucleótido antisentido de la apolipoproteína B. Los tratamientos se administran por vía intraperitoneal cada 2 días durante la primera semana y después cada 4 días. Los ratones con disolución salina solo u oligonucleótido de control sirven como grupos de control. Cada grupo de tratamiento contiene de 25 a 30 ratones. Después de 6 meses de tratamiento, se sacrifica un subconjunto de ratones en cada grupo de tratamiento. Al resto de los ratones se les deja un periodo de recuperación de 3 meses sin tratamiento, después de lo cual se sacrifican. Se mide la expresión del ARNm de la apolipoproteína B por PCR en tiempo real como se describe para otros métodos en la presente memoria. También se prepara tejido hepático para medir el contenido de triglicéridos usando el ensayo GPO de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se recoge suero y se evalúa el contenido de lípidos, incluyendo el colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos, usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY). También se miden las enzimas hepáticas ALT y AST en el suero, usando también el analizador clínico. Las muestras de suero se someten a análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo dirigido a la apolipoproteína B (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA). Los tejidos hepático, de riñón y otros se preparan por procedimientos rutinarios para los análisis histológicos. Se evalúa en los tejidos la presencia de gránulos basófilos e infiltrado inflamatorios. La esteatosis se evalúa por tinción con rojo oleoso O de las secciones de tejido hepático.

Ejemplo 67

Un modelo de ratón para la formación de placa aterosclerótica: ratones transgénicos para la apolipoproteína B que carecen del gen del receptor de LDL

El receptor de LDL es responsable de eliminar las partículas de LDL que contienen apolipoproteína B. Sin el receptor de LDL, los animales no pueden eliminar eficazmente las partículas de LDL que contienen apolipoproteína B del plasma. Por lo tanto los niveles en el plasma de apolipoproteína B y colesterol LDL son notablemente elevados. Se usan tanto ratones que expresan el transgén de la apolipoproteína B humana (TgN-hApoB +/+) como ratones deficientes para el receptor de LDL (LDLr -/-) como modelos animales de desarrollo de placa aterosclerótica. Cuando el genotipo de deficiencia de receptor de LDL se combina con el genotipo transgénico de apolipoproteína B humana (TgN-hApoB +/+; LDLr -/-), se desarrollan rápidamente placas ateroscleróticas.

Los ratones con este contexto genético se usan para investigar la capacidad de los compuestos para prevenir la aterosclerosis y la formación de placa.

Ratones macho TgN-hApoB +/+;LDLr -/- se tratan dos veces por semana con 10 ó 20 mg/kg de oligonucleótidos antisentido para la apolipoproteína B durante 12 semanas. Los grupos de control se tratan con disolución salina o con oligonucleótido de control. El colesterol total en el suero, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos se miden a las 2, 4, 6, 8 y 12 semanas mediante análisis clínico rutinario usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY). Se mide la proteína apolipoproteína B humana en el suero a las 2, 4, 6, 8 y 12 semanas usando un kit de ELISA (ALerCHEK Inc., Portland, ME). El ARNm de la apolipoproteína humana y de ratón en el hígado se mide a las 12 semanas. Los resultados del estudio de 12 semanas sirven para evaluar el comportamiento farmacológico de ISIS 301012 en un modelo doblemente transgénico.

Además, se lleva a cabo un estudio de 4 meses en ratones TgN-hApoB +/+;LDLr -/-, con las condiciones de tratamiento usadas en el estudio de 12 semanas. Los ratones se tratan durante 4 meses con oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la apolipoproteína B humana para evaluar la capacidad de dichos compuestos para prevenir la formación de placa aterosclerótica. Al final del periodo de tratamiento de 4 meses, los ratones se anestesian y se perfunden con formalina al 10%. Se aísla el árbol arterial perfundido y se examina la presencia de placas ateroscleróticas. Se sumergen en parafina secciones del árbol arterial y se preparan para el análisis histológico usando modelos rutinarios. El colesterol total en el suero, colesterol HDL, colesterol LDL y triglicéridos se miden a las 2, 4, 6, 8, 12 y 16 semanas mediante análisis clínico rutinario usando un analizador clínico Olympus (Olympus America Inc., Melville, NY). Se mide la proteína apolipoproteína B humana en el suero a las 2, 4, 6, 8, 12 y 16 semanas usando un kit de ELISA (ALerCHEK Inc., Portland, ME). Se mide el ARNm de apolipoproteína humana y de ratón en el hígado a las 16 semanas por PCR en tiempo real.

Ejemplo 68

Modelos de conejo para estudiar la formación de placa aterosclerótica

Se usa la variedad de conejo Watanabe con hiperlipidemia heredable (WHHL) como modelo para la formación de placa aterosclerótica. También se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda con una dieta con alto contenido en grasa como modelo de la formación de placa aterosclerótica. El tratamiento de los conejos WHHL o los conejos blancos de Nueva Zelanda alimentados con alto contenido en grasa, con compuestos antisentido para la apolipoproteína B, se usa para ensayar su potencial como tratamientos terapéuticos o profilácticos para la enfermedad de placa aterosclerótica. Se inyecta a los conejos 5, 10, 25 ó 50 mg/kg de oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B. Los animales tratados con disolución salina sola o un oligonucleótido de control

5 sirven como controles. A lo largo del tratamiento se recogen muestras de suero y se evalúan los niveles de proteína apolipoproteína B por ELISA (kit de ALerCHEK Inc., Portland, ME) y los lípidos en el suero (colesterol, colesterol LDL, colesterol VLDL, colesterol HDL, triglicéridos) por análisis clínico rutinario. El contenido de triglicéridos del tejido hepático se mide usando un ensayo GPO de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se obtienen tejidos de hígado, riñón, corazón, aorta y otros tejidos y se procesan para el análisis histológico usando procedimientos rutinarios. Se examina en los tejidos de hígado y riñón las pruebas de gránulos basófilos e infiltrados inflamatorios. Se evalúa en el tejido hepático la esteatosis usando tinte con rojo oleoso O. Además, se examinan secciones aórticas teñidas con rojo oleoso O y hematoxilina para evaluar la formación de lesiones ateroscleróticas.

Ejemplo 69

10 Suministro oral de inhibidores de la apolipoproteína B

15 Los oligonucleótidos se pueden formular para el suministro in vivo en una forma farmacéutica aceptable, p. ej., como formulaciones parenterales o no parenterales. Las formulaciones parenterales incluyen formulaciones intravenosa (IV), subcutánea (SC), intraperitoneal (IP), intravítrea e intramuscular (IM), así como formulaciones para el suministro por inhalación pulmonar, administración intranasal, administración tópica, etc. Las formulaciones no parenterales incluyen formulaciones para el suministro por el canal alimentario, p. ej., administración oral, administración rectal, instilación intrayeyunal etc. La administración rectal incluye administración como un enema o un supositorio. La administración oral incluye la administración de una cápsula, una cápsula de gel, una píldora, un elixir, etc.

20 En algunas realizaciones, se puede administrar un oligonucleótido a un sujeto por una vía de administración oral. El sujeto puede ser un animal o un ser humano (hombre). Un sujeto animal puede ser un mamífero, tal como un ratón, rata, ratón, una rata, un perro, un cobaya, un mono, un primate no humano, un gato o un cerdo. Los primates no humanos incluyen monos y chimpancés. Un sujeto animal adecuado puede ser un animal experimental, tal como un ratón, rata, ratón, una rata, un perro, un mono, un primate no humano, un gato o un cerdo.

25 En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente humano que necesita tratamiento terapéutico como se discute con más detalle en la presente memoria. En algunas realizaciones, el sujeto puede necesitar la modulación de la expresión de uno o más genes como se discute con más detalle en la presente memoria. En algunas realizaciones particulares, el sujeto puede necesitar la inhibición de la expresión de uno o más genes como se discute con más detalle en la presente memoria. En particular, el sujeto puede necesitar la modulación, es decir, inhibición o potenciación, de la apolipoproteína B con el fin de obtener las indicaciones terapéuticas discutidas con más detalle en la presente memoria.

30 En algunas realizaciones, las formulaciones de oligonucleótidos no parenterales (p. ej., orales) según la presente invención, producen una biodisponibilidad potenciada del oligonucleótido. En este contexto, el término "biodisponibilidad" se refiere a una medición de la porción de un fármaco administrado que llega al sistema circulatorio (por ejemplo, la sangre, especialmente el plasma sanguíneo) cuando se emplea un modo particular de administración para suministrar el fármaco. La biodisponibilidad potenciada se refiere a la capacidad de un modo de administración particular de suministrar el oligonucleótido al plasma de la sangre periférica de un sujeto, con respecto a otro modo de administración. Por ejemplo, cuando se usa un modo de administración no parenteral (p. ej., un modo oral) para introducir el fármaco en un sujeto, la biodisponibilidad para ese modo de administración se puede comparar con un modo diferente de administración, p. ej., un modo de administración IV. En algunas realizaciones, el área bajo la curva de la concentración del compuesto en el plasma sanguíneo (AUC_0) después de la administración no parenteral (p. ej. oral, rectal, intrayeyunal) se puede dividir entre el área bajo la curva de la concentración de fármaco en el plasma después de administración intravenosa (i.v.) (AUC_{iv}) para proporcionar un cociente adimensional (biodisponibilidad relativa, RB) que representa la fracción de compuesto absorbida por una ruta no parenteral comparado con la ruta IV. Se dice que la biodisponibilidad de una composición está potenciada en comparación con la biodisponibilidad de otra composición, cuando la biodisponibilidad relativa de la primera composición (RB_1) es mayor que la biodisponibilidad relativa de la segunda composición (RB_2).

35 En general, la biodisponibilidad se correlaciona con la eficacia terapéutica cuando la eficacia terapéutica de un compuesto está relacionada con la concentración sanguínea obtenida, incluso si el sitio de acción final del fármaco es intracelular (van Berge-Henegouwen et al., *Gastroenterol.*, 1977, 73, 300). Se han usado estudios de biodisponibilidad para determinar el grado de absorción intestinal de un fármaco, midiendo el cambio en los niveles del fármaco en la sangre periférica después de una dosis oral (DiSanto, Chapter 76 In: Remington=s Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, páginas 1451-1458).

40 En general, se dice que la biodisponibilidad de una composición oral está "potenciada" cuando su biodisponibilidad relativa es mayor que la biodisponibilidad de una composición que consiste sustancialmente en el oligonucleótido puro, es decir, el oligonucleótido en ausencia de un potenciador de la penetración.

45 55 La biodisponibilidad en el órgano se refiere a la concentración de un compuesto en un órgano. La biodisponibilidad en un órgano se puede medir en sujetos de ensayo por una variedad de medios, tales como mediante radiografía de todo el cuerpo. La biodisponibilidad en un órgano se puede modificar, por ejemplo, potenciar, con una o más modificaciones de un oligonucleótido, mediante el uso de uno o varios compuestos vehículos o excipientes, etc., tal y

como se describe con más detalle en esta memoria. En general, un aumento de la biodisponibilidad se traducirá en un aumento de la biodisponibilidad de un órgano.

Las composiciones de oligonucleótidos orales según la presente invención, pueden comprender uno o más "potenciadores de la penetración en la mucosa" conocidos también como "potenciadores de la absorción" o simplemente como "potenciadores de la penetración". Por consiguiente, algunas realizaciones de la invención comprenden al menos un oligonucleótido en combinación con al menos un potenciador de la penetración. En general, un potenciador de la penetración es una sustancia que facilita el transporte de un fármaco a través de la o las membranas mucosas asociadas con el modo de administración deseado, p. ej., membranas del epitelio intestinal. Por consiguiente, es deseable seleccionar uno o más potenciadores de la penetración que faciliten la absorción de un oligonucleótido, sin interferir con la actividad del oligonucleótido, y de modo que el oligonucleótido se pueda introducir en el cuerpo de un animal sin efectos secundarios inaceptables tales como toxicidad, irritación o respuestas alérgicas.

Las realizaciones de la presente invención proporcionan composiciones que comprenden uno o más potenciadores de la penetración farmacéuticamente aceptables y métodos de uso de dichas composiciones, que producen la biodisponibilidad mejorada de los oligonucleótidos administrados por modos de administración no parenterales. Hasta ahora, se han usado algunos potenciadores de la penetración para mejorar la biodisponibilidad de determinados fármacos. Véase Muranishi, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1 y Lee et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems*, 1991, 8, 91. Se ha encontrado que la absorción y el suministro de oligonucleótidos, moléculas relativamente complejas que se sabe que son difíciles de administrar a animales y el hombre, se pueden mejorar mucho incluso cuando se administran por medios no parenterales por el uso de una serie de diferentes clases de potenciadores de la penetración.

En algunas realizaciones, las composiciones para la administración no parenteral incluyen una o más modificaciones de oligonucleótidos naturales (es decir, desoxirribosil-oligonucleótidos completamente fosfodiéster y ribosil-oligonucleótidos completamente fosfodiéster). Dichas modificaciones pueden aumentar la afinidad de unión, estabilidad de nucleasa, permeabilidad celular o tisular, distribución tisular, u otra propiedad biológica o farmacocinética. Se pueden hacer modificaciones en la base, el conector o el azúcar, como se discute en general como más detalle en la presente memoria, en relación con la química de los oligonucleótidos. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones para administrar a un sujeto, y en particular las composiciones orales para administrar a un sujeto animal o humano, comprenderán oligonucleótidos modificados que tienen una o más modificaciones para potenciar la afinidad, estabilidad, distribución tisular u otras propiedades biológicas.

Los conectores modificados adecuados incluyen conectores fosforotioato. En algunas realizaciones de acuerdo con la invención, el oligonucleótido tiene al menos un conector fosforotioato. Los enlaces fosforotioato proporcionan estabilidad frente a nucleasas, así como características de unión de proteínas plasmáticas al oligonucleótido. La estabilidad frente a nucleasas es útil para aumentar la vida útil in vivo de los oligonucleótidos, mientras que la unión a proteínas plasmáticas disminuye la tasa de aclaramiento de primer paso del oligonucleótido a través de la excreción renal. En algunas realizaciones según la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos dos conectores fosforotioato. En algunas realizaciones en las que el oligonucleótido tiene exactamente n nucleósidos, el oligonucleótido tiene de 1 a $n-1$ enlaces fosforotioato. En algunas realizaciones en las que el oligonucleótido tiene exactamente n nucleósidos, el oligonucleótido tiene $n-1$ enlaces fosforotioato. En otras realizaciones en las que el oligonucleótido tiene exactamente n nucleósidos, y n es par, el oligonucleótido tiene de 1 a $n/2$ enlaces fosforotioato, o cuando n es impar, de 1 a $(n-1)/2$ enlaces fosforotioato. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene enlaces fosfodiéster (PO) y fosforotioato (PS) que alternan. En otras realizaciones, el oligonucleótido tiene un tramo de dos o más enlaces PO consecutivos y al menos un tramo de dos o más enlaces PS. En otras realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos dos tramos de enlaces PO interrumpidos por al menos un enlace PS.

En algunas realizaciones, al menos uno de los nucleósidos está modificado en la unidad de azúcar de ribosilo por una modificación que imparte estabilidad a la nucleasa, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa. En algunos casos, la modificación del azúcar incluye una modificación 2', p. ej. el 2'-OH del azúcar ribosilo se reemplaza o sustituye. Los reemplazos adecuados para el 2'-OH incluyen 2'-F y 2'-arabino-F. Las sustituciones adecuadas para el OH incluyen 2'-O-alquilo, p. ej. 2'-O-metilo y 2'-O-alquilo sustituido, p. ej. 2'-O-metoxietilo, 2'-O-aminopropilo, etc. En algunas realizaciones, el oligonucleótido contiene al menos una modificación 2'. En algunas realizaciones, el oligonucleótido contiene al menos 2 modificaciones 2'. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos una modificación 2' en cada uno de los extremos (es decir, los nucleósidos 3' y 5' terminales tienen cada uno las mismas o diferentes modificaciones 2'). En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos dos modificaciones 2' secuenciales en cada extremo del oligonucleótido. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden además al menos un desoxinucleósido. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos comprenden un tramo de desoxinucleósidos de modo que el tramo es capaz de activar la escisión por la RNasa (p. ej., RNasa H) de un ARN con el que es capaz de hibridar el oligonucleótido. En algunas realizaciones, un tramo de desoxinucleósidos capaz de activar la escisión mediada por la RNasa del ARN comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 16, p. ej. de aproximadamente 8 a aproximadamente 16 desoxinucleósidos consecutivos.

Las composiciones orales para la administración de composiciones de oligonucleótidos no parenterales de la presente invención, se pueden formular en diferentes formas de dosificación tales como, pero sin limitar, comprimidos, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. La expresión "suministro alimentario" abarca, p. ej., la administración oral, rectal, endoscópica y sublingual/bucal. Un requisito común para estos modos de administración es la absorción en alguna parte o en todo el tracto digestivo y la necesidad de la penetración eficaz en la mucosa del ácido o ácidos nucleicos así administrados.

El suministro de un fármaco por la mucosa oral, como es el caso de la administración bucal y sublingual, tiene varias características deseables, incluyendo, en muchos casos, una elevación más rápida de la concentración plasmática del fármaco que por el suministro oral (Harvey, capítulo 35 en: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, página 711).

Se puede usar la endoscopia para el suministro de fármaco directamente en una parte interior del tracto alimentario. Por ejemplo, la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE) aprovecha la gastroscopia extendida y permite el acceso selectivo al tracto biliar y al conducto pancreático (Hirahata et al., Gan To Kagaku Ryoho, 1992, 19(10 Suppl.), 1591). Las composiciones farmacéuticas, incluyendo las formulaciones de liposomas, se pueden suministrar directamente en porciones del canal digestivo, tales como, p. ej., el duodeno (Somogyi et al., Pharm. Res., 1995, 12, 149) o la submucosa gástrica (Akamo et al., Japanese J. Cancer Res., 1994, 85, 652) por medios endoscópicos. Los dispositivos de lavado gástrico (Inoue et al., Artif. Organs, 1997, 21, 28) y dispositivos de alimentación endoscópica percutáneos (Pennington et al., Ailment Pharmacol. Ther., 1995, 9, 471) también se pueden usar para el suministro alimentario directo de composiciones farmacéuticas.

En algunas realizaciones, las formulaciones de oligonucleótidos se pueden administrar por el ano en el recto o el intestino inferior. Se pueden usar supositorios rectales, enemas de retención o catéteres rectales para este propósito y pueden ser preferidos cuando de lo contrario puede ser difícil conseguir la observancia del paciente (p. ej., en aplicaciones pediátricas y geriátrica, o cuando el paciente está vomitando o está inconsciente). La administración oral puede producir niveles en la sangre más rápidos y más altos que la ruta oral. (Harvey, capítulo 35 en: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, página 711). Debido a que aproximadamente el 50% del fármaco que es absorbido del recto no pasará el hígado, la administración por esta vía reduce significativamente el potencial del metabolismo de primer paso (Benet et al., capítulo 1 en: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª Ed., Hardman et al., eds., McGraw-Hill, Nueva York, NY, 1996).

Un método ventajoso de las composiciones de oligonucleótidos de administración no parenteral es el suministro oral. Algunas realizaciones usan diferentes potenciadores de la penetración con el fin de realizar el transporte de oligonucleótidos y otros ácidos nucleicos a través de las membranas mucosa y epitelial. Los potenciadores de la penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco amplias categorías: tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Por consiguiente, algunas realizaciones comprenden composiciones de oligonucleótidos orales que comprenden al menos un miembro que consiste en tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Otras realizaciones comprenden el oligonucleótido oral que comprende al menos un ácido graso, p. ej., ácido cáprico o láurico, o combinaciones o sales de los mismos. Otras realizaciones comprenden métodos para potenciar la biodisponibilidad oral de un oligonucleótido, comprendiendo el método la coadministración del oligonucleótido y al menos un potenciador de la penetración.

Otros excipientes que se pueden añadir a las composiciones de oligonucleótidos orales incluyen tensioactivos (o "agentes tensioactivos"), que son entidades químicas que, cuando se disuelven en una disolución acuosa reducen la tensión superficial de la disolución o la tensión interfases entre la disolución acuosa y otro líquido, con el resultado de que se potencia la absorción de oligonucleótidos a través de la mucosa digestiva y otras membranas epiteliales. Además de las sales biliares y los ácidos grasos, los tensioactivos incluyen, por ejemplo, laurilsulfato sódico, éter de laurilo y polioxietileno-9 y éter de cetilo y polioxietileno-20 (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92); y emulsiones perfluoroquímicas, tales como FC-43 (Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Los ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración y se pueden usar en composiciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas y sus mono y di-glicéridos y/o sus sales fisiológicamente aceptables (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1; El-Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651).

En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos para el suministro oral comprenden al menos dos fases discretas, cuyas fases pueden comprender partículas, cápsulas, cápsulas de gel, microesferas, etc. Cada fase puede contener uno o más oligonucleótidos, potenciadores de la penetración, tensioactivos, bioadhesivos, agentes efervescentes, u otros adyuvantes, excipientes o diluyentes. En algunas realizaciones, una fase comprende al

menos un oligonucleótidos y al menos un potenciador de la penetración. En algunas realizaciones, una primera fase comprende al menos un oligonucleótido y al menos un potenciador de la penetración, mientras que una segunda fase comprende al menos un potenciador de la penetración. En algunas realizaciones, una primera fase comprende al menos un oligonucleótido y al menos un potenciador de la penetración, mientras que una segunda fase comprende al menos un potenciador de la penetración y sustancialmente no comprende oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos una fase se mezcla con al menos un retardante de la degradación, tal como un recubrimiento o una matriz, que retrasa la liberación del contenido de esta fase. En algunas realizaciones, al menos una fase, en algunas realizaciones, una primera fase comprende al menos un oligonucleótido, al menos un potenciador de la penetración, mientras que una segunda fase comprende al menos un potenciador de la penetración y un retardante de la liberación. En realizaciones particulares, un oligonucleótido oral comprende una primera fase que comprende partículas que contienen un oligonucleótido y un potenciador de la penetración, y una segunda fase que comprende partículas recubiertas con un agente retardante de la liberación y contienen potenciador de la penetración.

Una variedad de sales biliares también funcionan como potenciadores de la penetración para facilitar la absorción y la biodisponibilidad de los fármacos. Las funciones fisiológicas de la bilis incluyen el facilitar la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasa (Brunton, capítulo 38 en: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al., eds., McGraw-Hill, Nueva York, NY, 1996, páginas 934-935). Diferentes sales biliares naturales y sus derivados sintéticos actúan como potenciadores de la penetración. Por lo tanto la expresión "sal biliar" incluye cualquiera de los componentes naturales de la bilis así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales biliares de la invención incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o sus sal de sodio farmacéuticamente aceptable, colato de sodio), ácido deshídrocólico (deshidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicocolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (CDCA, quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidrofusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y éter de laurilo y polioxietileno-9 (POE) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, capítulo 39 en: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579).

En algunas realizaciones, los potenciadores de la penetración útiles en algunas realizaciones de la presente invención, son mezclas de compuestos potenciadores de la penetración. Uno de dichos potenciadores de la penetración es una mezcla de UDCA (y/o CDCA) con ácidos cáprico y/o láurico o sales de los mismos, p. ej., de sodio. Dichas mezclas son útiles para potenciar el suministro de sustancias biológicamente activas a través de las membranas mucosas, en particular de la mucosa intestinal. Otras mezclas de potenciadores de la penetración comprenden aproximadamente 5-95% de ácidos biliares o sal(es) de UDCA y/o CDCA con 5-95% de ácido cáprico y/o láurico. Los potenciadores de la penetración particulares son mezclas de las sales sódicas de UDCA, ácido cáprico y ácido láurico, en una relación de aproximadamente 1:2:2, respectivamente. Otro de dichos potenciadores de la penetración es una mezcla de ácido cáprico y láurico (o sales de los mismos) en una relación de 0,01:1 a 1:0,01 (base en moles). En realizaciones particulares, el ácido cáprico y el ácido láurico están presentes en relaciones molares de aproximadamente 0,1:1 a aproximadamente 1:0,1, en particular de aproximadamente 0,5:1 a aproximadamente 1:0,5.

Otros excipientes incluyen agentes quelantes, es decir, compuestos que eliminan iones metálicos de la disolución formando complejos con los mismos, con el resultado de que se potencia la absorción de los oligonucleótidos a través de la mucosa digestiva y otras mucosas. En relación con su uso como potenciadores de la penetración en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de que también sirven como inhibidores de DNasa, ya que la mayoría de las ADN nucleasas caracterizadas requieren un ión metálico divalente para la catálisis y por lo tanto son inhibidas por los agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315). Los agentes quelantes de la invención incluyen, pero sin limitar, etilendiaminatetraacetato de sodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (p. ej., salicilato, 5-metoxisalicilato y homovanilato de sodio), derivados de N-acilo del colágeno, derivados de laureth-9 y N-aminoacilo de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43).

Como se usa en la presente memoria, los potenciadores de la penetración no tensioactivos no quelantes se pueden definir como compuestos que demuestran actividad insignificante como agentes quelantes o como tensioactivos pero que, no obstante, potencian la absorción de oligonucleótidos a través de la mucosa digestiva y otras membranas mucosas (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1). Esta clase de potenciadores de la penetración incluye, pero sin limitar, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alkil- y 1-alkenilazacilo-alcanona (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco de sodio, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621).

También se pueden añadir agentes que potencian la captación de oligonucleótidos a nivel celular a las composiciones farmacéuticas y otras composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar lípidos

cati3nicos tales como la lipofectina (Junichi et al., patente de EE.UU. n3 5.705.188), derivados de glicerol cati3nicos y mol3culas policati3nicas, tales como polilisina (Lollo et al., solicitud PCT WO 97/30731).

Algunas composiciones de oligonucle3tidos orales tambi3n incorporan compuesto veh3culo en la formulaci3n. Como se usa en la presente memoria, el "compuesto veh3culo" o "veh3culo" se puede referir a un 3cido nucleico o an3logo del mismo, que puede ser inerte (es decir, no tiene actividad biol3gica por s3 mismo) o puede ser necesario para el transporte, reconocimiento o ruta de activaci3n o mediaci3n, o es reconocido como un 3cido nucleico por procesos in vivo que reducen la biodisponibilidad del 3cido nucleico que tiene actividad biol3gica, por ejemplo, degradando el 3cido nucleico biol3gicamente activo o promoviendo su eliminaci3n de la circulaci3n. La coadministraci3n de un 3cido nucleico y un compuesto veh3culo, t3picamente con un exceso de esta 3ltima sustancia, puede dar como resultado una reducci3n sustancial de la cantidad de 3cido nucleico recuperado en el h3gado, ri3n3n u otros dep3sitos extracirculatorios, supuestamente debido a la competici3n entre el compuesto veh3culo y el 3cido nucleico por un receptor com3n. Por ejemplo, la recuperaci3n de un oligonucle3tido parcialmente fosforotioato en tejido hep3tico se puede reducir cuando se coadministra con 3cido polinos3nico, sulfato de dextrano, 3cido policitidico o 3cido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-2,2'-disulf3nico (Miyao et al., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 5; Takakura et al., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177).

Un "veh3culo farmac3utico" o un "excipiente" puede ser un disolvente farmac3uticamente aceptable, un agente de suspensi3n o cualquier otro veh3culo farmacol3gicamente inerte para suministrar uno o varios 3cidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser l3quido o s3lido y se selecciona, con la forma de administraci3n planeada en mente, de modo que proporcione el volumen, consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un 3cido nucleico y los otros componentes de una composici3n farmac3utica dada. Los veh3culos farmac3uticos t3picos incluyen, pero sin limitar, agentes aglutinantes (p. ej., almid3n de ma3z pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (p. ej., lactosa y otros az3cares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poli3crilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco, s3lice, di3xido de silicio coloidal, 3cido estearico, estearatos met3licos, aceites vegetales hidrogenados, almid3n de ma3z, polietilenglicoles, benzoato s3dico, acetato s3dico, etc.); disgregantes (p. ej., almid3n, glicolato s3dico de almid3n, EXPLOTAB); y agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato s3dico, etc.).

Las composiciones orales de oligonucle3tidos pueden contener adicionalmente otros componentes auxiliares encontrados convencionalmente en composiciones farmac3uticas, en sus niveles de uso establecidos en la t3cnica. As3, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles, farmac3uticamente activos tales como, por ejemplo, agentes antiprur3ticos, astringentes, anest3sicos locales o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales 3tiles en la formulaci3n f3sica de diversas formas farmac3uticas de la composici3n de la presente invenci3n, tales como colorantes, agentes de sabor, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se a3aden, no deber3an interferir indebidamente con las actividades biol3gicas de los componentes de las composiciones de la presente invenci3n.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Crooke et al.

<120> MODULACI3N ANTISENTIDO DE LA EXPRESI3N DE LA APOLIPOPROTE3NA B

<130> 30566/39662

<150> US 60/426.234

<151> 13-11-2002

<150> PCT/US03/15493

<151> 13-05-2003

<160> 892

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucle3tido Antisentido

<400> 1

tccgcatcg ctctcaggg

20

<210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 2
 10 atgcattctg cccccaagga 20
 <210> 3
 <211> 14121
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 20 <222> (129)..(13820)
 <400> 3
 attcccaccg ggacctgcgg ggctgagtg ccttctcggg tgctgccgct gaggagcccg 60
 cccagccagc cagggccgcg aggccgaggc cagggccgcag cccaggagcc gccccaccgc 120
 agctggcg atg gac ccg ccg agg ccc gcg ctg ctg gcg ctg ctg gcg ctg ` 170
 Met Asp Pro Pro Arg Pro Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
 1 5 10
 cct gcg ctg ctg ctg ctg ctg gcg ggc gcc agg gcc gaa gag gaa 218
 Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Arg Ala Glu Glu Glu
 15 20 25 30
 atg ctg gaa aat gtc agc ctg gtc tgt cca aaa gat gcg acc cga ttc 266
 Met Leu Glu Asn Val Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Ala Thr Arg Phe
 35 40 45
 25

ES 2 420 914 T3

aag cac ctc cgg aag tac aca tac aac tat gag gct gag agt tcc agt	314
Lys His Leu Arg Lys Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu Ala Glu Ser Ser Ser	
50 55 60	
gga gtc cct ggg act gct gat tca aga agt gcc acc agg atc aac tgc	362
Gly Val Pro Gly Thr Ala Asp Ser Arg Ser Ala Thr Arg Ile Asn Cys	
65 70 75	
aag gtt gag ctg gag gtt ccc cag ctc tgc agc ttc atc ctg aag acc	410
Lys Val Glu Leu Glu Val Pro Gln Leu Cys Ser Phe Ile Leu Lys Thr	
80 85 90	
agc cag tgc acc ctg aaa gag gtg tat ggc ttc aac cct gag ggc aaa	458
Ser Gln Cys Thr Leu Lys Glu Val Tyr Gly Phe Asn Pro Glu Gly Lys	
95 100 105 110	
gcc ttg ctg aag aaa acc aag aac tct gag gag ttt gct gca gcc atg	506
Ala Leu Leu Lys Lys Thr Lys Asn Ser Glu Glu Phe Ala Ala Ala Met	
115 120 125	
tcc agg tat gag ctc aag ctg gcc att cca gaa ggg aag cag gtt ttc	554
Ser Arg Tyr Glu Leu Lys Leu Ala Ile Pro Glu Gly Lys Gln Val Phe	
130 135 140	
ctt tac ccg gag aaa gat gaa cct act tac atc ctg aac atc aag agg	602
Leu Tyr Pro Glu Lys Asp Glu Pro Thr Tyr Ile Leu Asn Ile Lys Arg	
145 150 155	
ggc atc att tct gcc ctc ctg gtt ccc cca gag aca gaa gaa gcc aag	650
Gly Ile Ile Ser Ala Leu Leu Val Pro Pro Glu Thr Glu Glu Ala Lys	
160 165 170	
caa gtg ttg ttt ctg gat acc gtg tat gga aac tgc tcc act cac ttt	698
Gln Val Leu Phe Leu Asp Thr Val Tyr Gly Asn Cys Ser Thr His Phe	
175 180 185 190	
acc gtc aag acg agg aag ggc aat gtg gca aca gaa ata tcc act gaa	746
Thr Val Lys Thr Arg Lys Gly Asn Val Ala Thr Glu Ile Ser Thr Glu	
195 200 205	
aga gac ctg ggg cag tgt gat cgc ttc aag ccc atc cgc aca ggc atc	794
Arg Asp Leu Gly Gln Cys Asp Arg Phe Lys Pro Ile Arg Thr Gly Ile	
210 215 220	
agc cca ctt gct ctc atc aaa ggc atg acc cgc ccc ttg tca act ctg	842
Ser Pro Leu Ala Leu Ile Lys Gly Met Thr Arg Pro Leu Ser Thr Leu	
225 230 235	
atc agc agc agc cag tcc tgt cag tac aca ctg gac gct aag agg aag	890
Ile Ser Ser Ser Gln Ser Cys Gln Tyr Thr Leu Asp Ala Lys Arg Lys	
240 245 250	
cat gtg gca gaa gcc atc tgc aag gag caa cac ctc ttc ctg cct ttc	938
His Val Ala Glu Ala Ile Cys Lys Glu Gln His Leu Phe Leu Pro Phe	
255 260 265 270	
tcc tac aac aat aag tat ggg atg gta gca caa gtg aca cag act ttg	986
Ser Tyr Asn Asn Lys Tyr Gly Met Val Ala Gln Val Thr Gln Thr Leu	
275 280 285	
aaa ctt gaa gac aca cca aag atc aac agc cgc ttc ttt ggt gaa ggt	1034

ES 2 420 914 T3

Lys	Leu	Glu	Asp	Thr	Pro	Lys	Ile	Asn	Ser	Arg	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly		
			290					295					300				
act	aag	aag	atg	ggc	ctc	gca	ttt	gag	agc	acc	aaa	tcc	aca	tca	cct	1082	
Thr	Lys	Lys	Met	Gly	Leu	Ala	Phe	Glu	Ser	Thr	Lys	Ser	Thr	Ser	Pro		
		305					310					315					
cca	aag	cag	gcc	gaa	gct	gtt	ttg	aag	act	ctc	cag	gaa	ctg	aaa	aaa	1130	
Pro	Lys	Gln	Ala	Glu	Ala	Val	Leu	Lys	Thr	Leu	Gln	Glu	Leu	Lys	Lys		
		320				325					330						
cta	acc	atc	tct	gag	caa	aat	atc	cag	aga	gct	aat	ctc	ttc	aat	aag	1178	
Leu	Thr	Ile	Ser	Glu	Gln	Asn	Ile	Gln	Arg	Ala	Asn	Leu	Phe	Asn	Lys		
					340					345					350		
ctg	gtt	act	gag	ctg	aga	ggc	ctc	agt	gat	gaa	gca	gtc	aca	tct	ctc	1226	
Leu	Val	Thr	Glu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Thr	Ser	Leu		
				355					360					365			
ttg	cca	cag	ctg	att	gag	gtg	tcc	agc	ccc	atc	act	tta	caa	gcc	ttg	1274	
Leu	Pro	Gln	Leu	Ile	Glu	Val	Ser	Ser	Pro	Ile	Thr	Leu	Gln	Ala	Leu		
			370					375					380				
gtt	cag	tgt	gga	cag	cct	cag	tgc	tcc	act	cac	atc	ctc	cag	tgg	ctg	1322	
Val	Gln	Cys	Gly	Gln	Pro	Gln	Cys	Ser	Thr	His	Ile	Leu	Gln	Trp	Leu		
		385					390					395					
aaa	cgt	gtg	cat	gcc	aac	ccc	ctt	ctg	ata	gat	gtg	gtc	acc	tac	ctg	1370	
Lys	Arg	Val	His	Ala	Asn		Leu	Leu	Ile	Asp	Val	Val	Thr	Tyr	Leu		
		400				405					410						
gtg	gcc	ctg	atc	ccc	gag	ccc	tca	gca	cag	cag	ctg	cga	gag	atc	ttc	1418	
Val	Ala	Leu	Ile	Pro	Glu	Pro	Ser	Ala	Gln	Gln	Leu	Arg	Glu	Ile	Phe		
		415			420					425					430		
aac	atg	gcg	agg	gat	cag	cgc	agc	cga	gcc	acc	ttg	tat	gcg	ctg	agc	1466	
Asn	Met	Ala	Arg	Asp	Gln	Arg	Ser	Arg	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Leu	Ser		
			435					440					445				
cac	gcg	gtc	aac	aac	tat	cat	aag	aca	aac	cct	aca	ggg	acc	cag	gag	1514	
His	Ala	Val	Asn	Asn	Tyr	His	Lys	Asn	Asn	Pro	Thr	Gly	Thr	Gln	Glu		
			450					455				460					
ctg	ctg	gac	att	gct	aat	tac	ctg	atg	gaa	cag	att	caa	gat	gac	tgc	1562	
Leu	Leu	Asp	Ile	Ala	Asn	Tyr	Leu	Met	Glu	Gln	Ile	Gln	Asp	Asp	Cys		
		465				470						475					
act	ggg	gat	gaa	gat	tac	acc	tat	ttg	att	ctg	cgg	gtc	att	gga	aat	1610	
Thr	Gly	Asp	Glu	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Ile	Leu	Arg	Val	Ile	Gly	Asn		
		480				485				490							
atg	ggc	caa	acc	atg	gag	cag	tta	act	cca	gaa	ctc	aag	tct	tca	atc	1658	
Met	Gly	Gln	Thr	Met	Glu	Gln	Leu	Thr	Pro	Glu	Leu	Lys	Ser	Ser	Ile		
		495			500					505					510		
ctc	aaa	tgt	gtc	caa	agt	aca	aag	cca	tca	ctg	atg	atc	cag	aaa	gct	1706	
Leu	Lys	Cys	Val	Gln	Ser	Thr	Lys	Pro	Ser	Leu	Met	Ile	Gln	Lys	Ala		
			515					520					525				
gcc	atc	cag	gct	ctg	cgg	aaa	atg	gag	cct	aaa	gac	aag	gac	cag	gag	1754	
Ala	Ile	Gln	Ala	Leu	Arg	Lys	Met	Glu	Pro	Lys	Asp	Lys	Asp	Gln	Glu		
			530					535					540				

ES 2 420 914 T3

gtt ctt ctt cag act ttc ctt gat gat gct tct ccg gga gat aag cga	1802
Val Leu Leu Gln Thr Phe Leu Asp Asp Ala Ser Pro Gly Asp Lys Arg	
545 550 555	
ctg gct gcc tat ctt atg ttg atg agg agt cct tca cag gca gat att	1850
Leu Ala Ala Tyr Leu Met Leu Met Arg Ser Pro Ser Gln Ala Asp Ile	
560 565 570	
aac aaa att gtc caa att cta cca tgg gaa cag aat gag caa gtg aag	1898
Asn Lys Ile Val Gln Ile Leu Pro Trp Glu Gln Asn Glu Gln Val Lys	
575 580 585 590	
aac ttt gtg gct tcc cat att gcc aat atc ttg aac tca gaa gaa ttg	1946
Asn Phe Val Ala Ser His Ile Ala Asn Ile Leu Asn Ser Glu Glu Leu	
595 600 605	
gat atc caa gat ctg aaa aag tta gtg aaa gaa gct ctg aaa gaa tct	1994
Asp Ile Gln Asp Leu Lys Lys Leu Val Lys Glu Ala Leu Lys Glu Ser	
610 615 620	
caa ctt cca act gtc atg gac ttc aga aaa ttc tct ccg aac tat caa	2042
Gln Leu Pro Thr Val Met Asp Phe Arg Lys Phe Ser Arg Asn Tyr Gln	
625 630 635	
ctc tac aaa tct gtt tct ctt cca tca ctt gac cca gcc tca gcc aaa	2090
Leu Tyr Lys Ser Val Ser Leu Pro Ser Leu Asp Pro Ala Ser Ala Lys	
640 645 650	
ata gaa ggg aat ctt ata ttt gat cca aat aac tac ctt cct aaa gaa	2138
Ile Glu Gly Asn Leu Ile Phe Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Pro Lys Glu	
655 660 665 670	
agc atg ctg aaa act acc ctc act gcc ttt gga ttt gct tca gct gac	2186
Ser Met Leu Lys Thr Thr Leu Thr Ala Phe Gly Phe Ala Ser Ala Asp	
675 680 685	
ctc atc gag att ggc ttg gaa gga aaa ggc ttt gag cca aca ttg gaa	2234
Leu Ile Glu Ile Gly Leu Glu Gly Lys Gly Phe Glu Pro Thr Leu Glu	
690 695 700	
gct ctt ttt ggg aag caa gga ttt ttc cca gac agt gtc aac aaa gct	2282
Ala Leu Phe Gly Lys Gln Gly Phe Phe Pro Asp Ser Val Asn Lys Ala	
705 710 715	
ttg tac tgg gtt aat ggt caa gtt cct gat ggt gtc tct aag gtc tta	2330
Leu Tyr Trp Val Asn Gly Gln Val Pro Asp Gly Val Ser Lys Val Leu	
720 725 730	
gtg gac cac ttt ggc tat acc aaa gat gat aaa cat gag cag gat atg	2378
Val Asp His Phe Gly Tyr Thr Lys Asp Asp Lys His Glu Gln Asp Met	
735 740 745 750	
gta aat gga ata atg ctc agt gtt gag aag ctg att aaa gat ttg aaa	2426
Val Asn Gly Ile Met Leu Ser Val Glu Lys Leu Ile Lys Asp Leu Lys	
755 760 765	
tcc aaa gaa gtc ccg gaa gcc aga gcc tac ctc cgc atc ttg gga gag	2474
Ser Lys Glu Val Pro Glu Ala Arg Ala Tyr Leu Arg Ile Leu Gly Glu	
770 775 780	
gag ctt ggt ttt gcc agt ctc cat gac ctc cag ctc ctg gga aag ctg	2522
Glu Leu Gly Phe Ala Ser Leu His Asp Leu Gln Leu Leu Gly Lys Leu	

ES 2 420 914 T3

785	790	795	
ctt ctg atg ggt gcc cgc act Leu Leu Met Gly Ala Arg Thr 800 805	ctg cag ggg atc ccc cag atg att gga Leu Gln Gly Ile Pro Gln Met Ile Gly 810		2570
gag gtc atc agg aag ggc tca aag aat gac ttt ttt ctt cac tac atc Glu Val Ile Arg Lys Gly Ser Lys Asn Asp Phe Phe Leu His Tyr Ile 815 820 825 830			2618
ttc atg gag aat gcc ttt gaa ctc ccc act gga gct gga tta cag ttg Phe Met Glu Asn Phe Glu Leu Pro Thr Gly Ala Gly Leu Gln Leu 835 840 845			2666
caa ata tct tca tct gga gtc att gct ccc gga gcc aag gct gga gta Gln Ile Ser Ser Ser Gly Val Ile Ala Pro Gly Ala Lys Ala Gly Val 850 855 860			2714
aaa ctg gaa gta gcc aac atg cag gct gaa ctg gtg gca aaa ccc tcc Lys Leu Val Ala Asn Met Gln Ala Glu Leu Val Ala Lys Pro Ser 865 870 875			2762
gtg tct gtg gag ttt gtg aca aat atg ggc atc atc att ccg gac ttc Val Ser Val Glu Phe Val Thr Asn Met Gly Ile Ile Ile Pro Asp Phe 880 885 890			2810
gct agg agt ggg gtc cag atg aac acc aac ttc ttc cac gag tcg ggt Ala Arg Ser Gly Val Gln Met Asn Thr Asn Phe Phe His Glu Ser Gly 895 900 905 910			2858
ctg gag gct cat gtt gcc cta aaa gct ggg aag ctg aag ttt atc att Leu Glu Ala His Val Ala Leu Lys Ala Gly Lys Leu Lys Phe Ile Ile 915 920 925			2906
cct tcc cca aag aga cca gtc aag ctg ctc agt gga ggc aac aca tta Pro Ser Pro Lys Arg Pro Val Lys Leu Ser Gly Gly Asn Thr Leu 930 935 940			2954
cat ttg gtc tct acc acc aaa acg gag gtg atc cca cct ctc att gag His Leu Val Ser Thr Thr Lys Thr Glu Val Ile Pro Pro Leu Ile Glu 945 950 955			3002
aac agg cag tcc tgg tca gtt tgc aag caa gtc ttt cct ggc ctg aat Asn Arg Gln Ser Trp Ser Val Cys Lys Gln Val Phe Pro Gly Leu Asn 960 965 970			3050
tac tgc acc tca ggc gct tac tcc aac gcc agc tcc aca gac tcc gcc Tyr Cys Thr Ser Gly Ala Tyr Ser Asn Ala Ser Ser Thr Asp Ser Ala 975 980 985 990			3098
tcc tac tat ccg ctg acc ggg gac acc aga tta gag ctg gaa ctg agg Ser Tyr Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Arg Leu Glu Leu Glu Leu Arg 995 1000 1005			3146
cct aca gga gag att gag cag tat tct gtc agc gca acc tat gag ctc Pro Thr Gly Glu Ile Glu Gln Tyr Ser Val Ser Ala Thr Tyr Glu Leu 1010 1015 1020			3194
cag aga gag gac aga gcc ttg gtg gat acc ctg aag ttt gta act caa Gln Arg Glu Asp Arg Ala Leu Val Asp Thr Leu Lys Phe Val Thr Gln 1025 1030 1035			3242
gca gaa ggt gcg aag cag act gag gct acc atg aca ttc aaa tat aat			3290

ES 2 420 914 T3

Ala	Glu	Gly	Ala	Lys	Gln	Thr	Glu	Ala	Thr	Met	Thr	Phe	Lys	Tyr	Asn	
1040						1045					1050					
cgg	cag	agt	atg	acc	ttg	tcc	agt	gaa	gtc	caa	att	ccg	gat	ttt	gat	3338
Arg	Gln	Ser	Met	Thr	Leu	Ser	Ser	Glu	Val	Gln	Ile	Pro	Asp	Phe	Asp	
1055					1060					1065					1070	
ggt	gac	ctc	gga	aca	atc	ctc	aga	ggt	aat	gat	gaa	tct	act	gag	ggc	3386
Val	Asp	Leu	Gly	Thr	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Asp	Glu	Ser	Thr	Glu	Gly	
				1075					1080						1085	
aaa	acg	tct	tac	aga	ctc	acc	ctg	gac	att	cag	aac	aag	aaa	att	act	3434
Lys	Thr	Ser	Tyr	Arg	Leu	Thr	Leu	Asp	Ile	Gln	Asn	Lys	Lys	Ile	Thr	
			1090					1095						1100		
gag	gtc	gcc	ctc	atg	ggc	cac	cta	agt	tgt	gac	aca	aag	gaa	gaa	aga	3482
Glu	Val	Ala	Leu	Met	Gly	His	Leu	Ser	Cys	Asp	Thr	Lys	Glu	Glu	Arg	
		1105					1110					1115				
aaa	atc	aag	ggt	ggt	att	tcc	ata	ccc	cgt	ttg	caa	gca	gaa	gcc	aga	3530
Lys	Ile	Lys	Gly	Val	Ile	Ser	Ile	Pro	Arg	Leu	Gln	Ala	Glu	Ala	Arg	
	1120					1125					1130					
agt	gag	atc	ctc	gcc	cac	tgg	tgc	cct	gcc	aaa	ctg	ctt	ctc	caa	atg	3578
Ser	Glu	Ile	Leu	Ala	His	Trp	Ser	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Leu	Gln	Met	
1135					1140					1145					1150	
gac	tca	tct	gct	aca	gct	tat	ggc	tcc	aca	ggt	tcc	aag	agg	gtg	gca	3626
Asp	Ser	Ser	Ala	Thr	Ala	Tyr	Gly	Ser	Thr	Val	Ser	Lys	Arg	Val	Ala	
				1155					1160						1165	
tgg	cat	tat	gat	gaa	gag	aag	att	gaa	ttt	gaa	tgg	aac	aca	ggc	acc	3674
Trp	His	Tyr	Asp	Glu	Glu	Lys	Ile	Glu	Phe	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	Thr	
			1170					1175						1180		
aat	gta	gat	acc	aaa	aaa	atg	act	tcc	aat	ttc	cct	gtg	gat	ctc	tcc	3722
Asn	Val	Asp	Thr	Lys	Lys	Met	Thr	Ser	Asn	Phe	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	
			1185				1190						1195			
gat	tat	cct	aag	agc	ttg	cat	atg	tat	gct	aat	aga	ctc	ctg	gat	cac	3770
Asp	Tyr	Pro	Lys	Ser	Leu	His	Met	Tyr	Ala	Asn	Arg	Leu	Leu	Asp	His	
	1200					1205					1210					
aga	gtc	cct	gaa	aca	gac	atg	act	ttc	cgg	cac	gtg	ggt	tcc	aaa	tta	3818
Arg	Val	Pro	Glu	Thr	Asp	Met	Thr	Phe	Arg	His	Val	Gly	Ser	Lys	Leu	
1215					1220					1225					1230	
ata	ggt	gca	atg	agc	tca	tgg	ctt	cag	aag	gca	tct	ggg	agt	ctt	cct	3866
Ile	Val	Ala	Met	Ser	Ser	Trp	Leu	Gln	Lys	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	Pro	
				1235					1240						1245	
tat	acc	cag	act	ttg	caa	gac	cac	ctc	aat	agc	ctg	aag	gag	ttc	aac	3914
Tyr	Thr	Gln	Thr	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asn	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Asn	
			1250					1255						1260		
ctc	cag	aac	atg	gga	ttg	cca	gac	ttc	cac	atc	cca	gaa	aac	ctc	ttc	3962
Leu	Gln	Asn	Met	Gly	Leu	Pro	Asp	Phe	His	Ile	Pro	Glu	Asn	Leu	Phe	
		1265					1270						1275			
tta	aaa	agc	gat	ggc	cgg	gtc	aaa	tat	acc	ttg	aac	aag	aac	agt	ttg	4010
Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Arg	Val	Lys	Tyr	Thr	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Leu	

ES 2 420 914 T3

1280	1285	1290	
aaa att gag att cct ttg cct ttt ggt ggc aaa tcc tcc aga gat cta Lys Ile Glu Ile Pro Leu Pro Phe Gly Gly Lys Ser Ser Arg Asp Leu 1295 1300 1305 1310			4058
aag atg tta gag act gtt agg aca cca gcc ctc cac ttc aag tct gtg Lys Met Leu Glu Thr Val Arg Thr Pro Ala Leu His Phe Lys Ser Val 1315 1320 1325			4106
gga ttc cat ctg cca tct cga gag ttc caa gtc cct act ttt acc att Gly Phe His Leu Pro Ser Arg Glu Phe Gln Val Pro Thr Phe Thr Ile 1330 1335 1340			4154
ccc aag ttg tat caa ctg caa gtg cct ctc ctg ggt gtt cta gac ctc Pro Lys Leu Tyr Gln Leu Gln Val Pro Leu Leu Gly Val Leu Asp Leu 1345 1350 1355			4202
tcc acg aat gtc tac agc aac ttg tac aac tgg tcc gcc tcc tac agt Ser Thr Asn Val Tyr Ser Asn Leu Tyr Asn Trp Ser Ala Ser Tyr Ser 1360 1365 1370			4250
ggt ggc aac acc agc aca gac cat ttc agc ctt cgg gct cgt tac cac Gly Gly Asn Thr Ser Thr Asp His Phe Ser Leu Arg Ala Arg Tyr His 1375 1380 1385 1390			4298
atg aag gct gac tct gtg gtt gac ctg ctt tcc tac aat gtg caa gga Met Lys Ala Asp Ser Val Val Asp Leu Leu Ser Tyr Asn Val Gln Gly 1395 1400 1405			4346
tct gga gaa aca aca tat gac cac aag aat acg ttc aca cta tca tgt Ser Gly Glu Thr Tyr Asp His Lys Asn Thr Phe Thr Leu Ser Cys 1410 1415 1420			4394
gat ggg tct cta cgc cac aaa ttt cta gat tcg aat atc aaa ttc agt Asp Gly Ser Leu Arg His Lys Phe Leu Asp Ser Asn Ile Lys Phe Ser 1425 1430 1435			4442
cat gta gaa aaa ctt gga aac aac cca gtc tca aaa ggt tta cta ata His Val Glu Lys Leu Gly Asn Asn Pro Val Ser Lys Gly Leu Leu Ile 1440 1445 1450			4490
ttc gat gca tct agt tcc tgg gga cca cag atg tct gct tca gtt cat Phe Asp Ala Ser Ser Ser Trp Gly Pro Gln Met Ser Ala Ser Val His 1455 1460 1465 1470			4538
ttg gac tcc aaa aag aaa cag cat ttg ttt gtc aaa gaa gtc aag att Leu Asp Ser Lys Lys Lys Gln His Leu Phe Val Lys Glu Val Lys Ile 1475 1480 1485			4586
gat ggg cag ttc aga gtc tct tcg ttc tat gct aaa ggc aca tat ggc Asp Gly Gln Phe Arg Val Ser Ser Phe Tyr Ala Lys Gly Thr Tyr Gly 1490 1495 1500			4634
ctg tct tgt cag agg gat cct aac act ggc cgg ctc aat gga gag tcc Leu Ser Cys Gln Arg Asp Pro Asn Thr Gly Arg Leu Asn Gly Glu Ser 1505 1510 1515			4682
aac ctg agg ttt aac tcc tcc tac ctc caa ggc acc aac cag ata aca Asn Leu Arg Phe Asn Ser Ser Tyr Leu Gln Gly Thr Asn Gln Ile Thr 1520 1525 1530			4730

ES 2 420 914 T3

gga aga tat gaa gat gga acc ctc tcc ctc acc tcc acc tct gat ctg	4778
Gly Arg Tyr Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Thr Ser Thr Ser Asp Leu	
1535 1540 1545 1550	
caa agt ggc atc att aaa aat act gct tcc cta aag tat gag aac tac	4826
Gln Ser Gly Ile Ile Lys Asn Thr Ala Ser Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr	
1555 1560 1565	
gag ctg act tta aaa tct gac acc aat ggg aag tat aag aac ttt gcc	4874
Glu Leu Thr Leu Lys Ser Asp Thr Asn Gly Lys Tyr Lys Asn Phe Ala	
1570 1575 1580	
act tct aac aag atg gat atg acc ttc tct aag caa aat gca ctg ctg	4922
Thr Ser Asn Lys Met Asp Met Thr Phe Ser Lys Gln Asn Ala Leu Leu	
1585 1590 1595	
cgt tct gaa tat cag gct gat tac gag tca ttg agg ttc ttc agc ctg	4970
Arg Ser Glu Tyr Gln Ala Asp Tyr Glu Ser Leu Arg Phe Phe Ser Leu	
1600 1605 1610	
ctt tct gga tca cta aat tcc cat ggt ctt gag tta aat gct gac atc	5018
Leu Ser Gly Ser Leu Asn Ser His Gly Leu Glu Leu Asn Ala Asp Ile	
1615 1620 1625 1630	
tta ggc act gac aaa att aat agt ggt gct cac aag gcg aca cta agg	5066
Leu Gly Thr Asp Lys Ile Asn Ser Gly Ala His Lys Ala Thr Leu Arg	
1635 1640 1645	
att ggc caa gat gga ata tct acc agt gca acg acc aac ttg aag tgt	5114
Ile Gly Gln Asp Gly Ile Ser Thr Ser Ala Thr Thr Asn Leu Lys Cys	
1650 1655 1660	
agt ctc ctg gtg ctg gag aat gag ctg aat gca gag ctt ggc ctc tct	5162
Ser Leu Leu Val Leu Glu Asn Glu Leu Asn Ala Glu Leu Gly Leu Ser	
1665 1670 1675	
ggg gca tct atg aaa tta aca aca aat ggc cgc ttc agg gaa cac aat	5210
Gly Ala Ser Met Lys Leu Thr Thr Asn Gly Arg Phe Arg Glu His Asn	
1680 1685 1690	
gca aaa ttc agt ctg gat ggg aaa gcc gcc ctc aca gag cta tca ctg	5258
Ala Lys Phe Ser Leu Asp Gly Lys Ala Ala Leu Thr Glu Leu Ser Leu	
1695 1700 1705 1710	
gga agt gct tat cag gcc atg att ctg ggt gtc gac agc aaa aac att	5306
Gly Ser Ala Tyr Gln Ala Met Ile Leu Gly Val Asp Ser Lys Asn Ile	
1715 1720 1725	
ttc aac ttc aag gtc agt caa gaa gga ctt aag ctc tca aat gac atg	5354
Phe Asn Phe Lys Val Ser Gln Glu Gly Leu Lys Leu Ser Asn Asp Met	
1730 1735 1740	
atg ggc tca tat gct gaa atg aaa ttt gac cac aca aac agt ctg aac	5402
Met Gly Ser Tyr Ala Glu Met Lys Phe Asp His Thr Asn Ser Leu Asn	
1745 1750 1755	
att gca ggc tta tca ctg gac ttc tct tca aaa ctt gac aac att tac	5450
Ile Ala Gly Leu Ser Leu Asp Phe Ser Ser Lys Leu Asp Asn Ile Tyr	
1760 1765 1770	
agc tct gac aag ttt tat aag caa act gtt aat tta cag cta cag ccc	5498
Ser Ser Asp Lys Phe Tyr Lys Gln Thr Val Asn Leu Gln Leu Gln Pro	

ES 2 420 914 T3

1775	1780	1785	1790	
tat tct ctg gta act act tta aac agt gac ctg aaa tac aat gct ctg				5546
Tyr Ser Leu Val Thr Thr Leu Asn Ser Asp Leu Lys Tyr Asn Ala Leu	1795	1800	1805	
gat ctc acc aac aat ggg aaa cta cgg cta gaa ccc ctg aag ctg cat				5594
Asp Leu Thr Asn Asn Gly Lys Leu Arg Leu Glu Pro Leu Lys Leu His	1810	1815	1820	
gtg gct ggt aac cta aaa gga gcc tac caa aat aat gaa ata aaa cac				5642
Val Ala Gly Asn Leu Lys Gly Ala Tyr Gln Asn Asn Glu Ile Lys His	1825	1830	1835	
atc tat gcc atc tct tct gct gcc tta tca gca agc tat aaa gca gac				5690
Ile Tyr Ala Ile Ser Ser Ala Leu Ser Ala Ser Tyr Lys Ala Asp	1840	1845	1850	
act gtt gct aag gtt cag ggt gtg gag ttt agc cat cgg ctc aac aca				5738
Thr Val Ala Lys Val Gln Gly Val Glu Phe Ser His Arg Leu Asn Thr	1855	1860	1865	1870
gac atc gct ggg ctg gct tca gcc att gac atg agc aca aac tat aat				5786
Asp Ile Ala Gly Leu Ala Ser Ala Ile Asp Met Ser Thr Asn Tyr Asn	1875	1880	1885	
tca gac tca ctg cat ttc agc aat gtc ttc cgt tct gta atg gcc ccg				5834
Ser Asp Ser Leu His Phe Ser Asn Val Phe Arg Ser Val Met Ala Pro	1890	1895	1900	
ttt acc atg acc atc gat gca cat aca aat ggc aat ggg aaa ctc gct				5882
Phe Thr Met Thr Ile Asp Ala His Thr Asn Gly Asn Gly Lys Leu Ala	1905	1910	1915	
ctc tgg gga gaa cat act ggg cag ctg tat agc aaa ttc ctg ttg aaa				5930
Leu Trp Gly Glu His Thr Gly Gln Leu Tyr Ser Lys Phe Leu Leu Lys	1920	1925	1930	
gca gaa cct ctg gca ttt act ttc tct cat gat tac aaa ggc tcc aca				5978
Ala Glu Pro Leu Ala Phe Thr Phe Ser His Asp Tyr Lys Gly Ser Thr	1935	1940	1945	1950
agt cat cat ctc gtg tct agg aaa agc atc agt gca gct ctt gaa cac				6026
Ser His His Leu Val Ser Arg Lys Ser Ile Ser Ala Ala Leu Glu His	1955	1960	1965	
aaa gtc agt gcc ctg ctt act cca gct gag cag aca ggc acc tgg aaa				6074
Lys Val Ser Ala Leu Leu Thr Pro Ala Glu Gln Thr Gly Thr Trp Lys	1970	1975	1980	
ctc aag acc caa ttt aac aac aat gaa tac agc cag gac ttg gat gct				6122
Leu Lys Thr Gln Phe Asn Asn Asn Glu Tyr Ser Gln Asp Leu Asp Ala	1985	1990	1995	
tac aac act aaa gat aaa att ggc gtg gag ctt act gga cga act ctg				6170
Tyr Asn Thr Lys Asp Lys Ile Gly Val Glu Leu Thr Gly Arg Thr Leu	2000	2005	2010	
gct gac cta act cta cta gac tcc cca att aaa gtg cca ctt tta ctc				6218
Ala Asp Leu Thr Leu Leu Asp Ser Pro Ile Lys Val Pro Leu Leu Leu	2015	2020	2025	2030
agt gag ccc atc aat atc att gat gct tta gag atg aga gat gcc gtt				6266

ES 2 420 914 T3

Ser	Glu	Pro	Ile	Asn	Ile	Ile	Asp	Ala	Leu	Glu	Met	Arg	Asp	Ala	Val	
				2035					2040						2045	
gag	aag	ccc	caa	gaa	ttt	aca	att	gtt	gct	ttt	gta	aag	tat	gat	aaa	6314
Glu	Lys	Pro	Gln	Glu	Phe	Thr	Ile	Val	Ala	Phe	Val	Lys	Tyr	Asp	Lys	
			2050					2055					2060			
aac	caa	gat	gtt	cac	tcc	att	aac	ctc	cca	ttt	ttt	gag	acc	ttg	caa	6362
Asn	Gln	Asp	Val	His	Ser	Ile	Asn	Leu	Pro	Phe	Phe	Glu	Thr	Leu	Gln	
			2065				2070					2075				
gaa	tat	ttt	gag	agg	aat	cga	caa	acc	att	ata	gtt	gta	gtg	gaa	aac	6410
Glu	Tyr	Phe	Glu	Arg	Asn	Arg	Gln	Thr	Ile	Ile	Val	Val	Val	Glu	Asn	
	2080					2085					2090					
gta	cag	aga	aac	ctg	aag	cac	atc	aat	att	gat	caa	ttt	gta	aga	aaa	6458
Val	Gln	Arg	Asn	Leu	Lys	His	Ile	Asn	Ile	Asp	Gln	Phe	Val	Arg	Lys	
	2095				2100					2105					2110	
tac	aga	gca	gcc	ctg	gga	aaa	ctc	cca	cag	caa	gct	aat	gat	tat	ctg	6506
Tyr	Arg	Ala	Ala	Leu	Gly	Lys	Leu	Pro	Gln	Gln	Ala	Asn	Asp	Tyr	Leu	
				2115					2120					2125		
aat	tca	ttc	aat	tgg	gag	aga	caa	gtt	tca	cat	gcc	aag	gag	aaa	ctg	6554
Asn	Ser	Phe	Asn	Trp	Glu	Arg	Gln	Ser	His	Ala	Lys	Glu	Lys	Leu		
			2130				2135						2140			
act	gct	ctc	aca	aaa	aag	tat	aga	att	aca	gaa	aat	gat	ata	caa	att	6602
Thr	Ala	Leu	Thr	Lys	Lys	Tyr	Arg	Ile	Thr	Glu	Asn	Asp	Ile	Gln	Ile	
			2145				2150					2155				
gca	tta	gat	gat	gcc	aaa	atc	aac	ttt	aat	gaa	aaa	cta	tct	caa	ctg	6650
Ala	Leu	Asp	Asp	Ala	Lys	Ile	Asn	Phe	Asn	Glu	Lys	Leu	Ser	Gln	Leu	
			2160			2165					2170					
cag	aca	tat	atg	ata	caa	ttt	gat	cag	tat	att	aaa	gat	agt	tat	gat	6698
Gln	Thr	Tyr	Met	Ile	Gln	Phe	Asp	Gln	Tyr	Ile	Lys	Asp	Ser	Tyr	Asp	
	2175				2180					2185					2190	
tta	cat	gat	ttg	aaa	ata	gct	att	gct	aat	att	att	gat	gaa	atc	att	6746
Leu	His	Asp	Leu	Lys	Ile	Ala	Ile	Ala	Asn	Ile	Ile	Asp	Glu	Ile	Ile	
				2195				2200						2205		
gaa	aaa	tta	aaa	agt	ctt	gat	gag	cac	tat	cat	atc	cgt	gta	aat	tta	6794
Glu	Lys	Leu	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	His	Tyr	His	Ile	Arg	Val	Asn	Leu	
			2210				2215					2220				
gta	aaa	aca	atc	cat	gat	cta	cat	ttg	ttt	att	gaa	aat	att	gat	ttt	6842
Val	Lys	Thr	Ile	His	Asp	Leu	His	Leu	Phe	Ile	Glu	Asn	Ile	Asp	Phe	
			2225				2230					2235				
aac	aaa	agt	gga	agt	agt	act	gca	tcc	tgg	att	caa	aat	gtg	gat	act	6890
Asn	Lys	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Trp	Ile	Gln	Asn	Val	Asp	Thr	
			2240			2245				2250						
aag	tac	caa	atc	aga	atc	cag	ata	caa	gaa	aaa	ctg	cag	cag	ctt	aag	6938
Lys	Tyr	Gln	Ile	Arg	Ile	Gln	Ile	Gln	Glu	Lys	Leu	Gln	Gln	Leu	Lys	
	2255				2260				2265					2270		
aga	cac	ata	cag	aat	ata	gac	atc	cag	cac	cta	gct	gga	aag	tta	aaa	6986
Arg	His	Ile	Gln	Asn	Ile	Asp	Ile	Gln	His	Leu	Ala	Gly	Lys	Leu	Lys	
			2275					2280						2285		

ES 2 420 914 T3

caa cac att gag gct att gat gtt aga gtg ctt tta gat caa ttg gga Gln His Ile Glu Ala Ile Asp Val Arg Val Leu Leu Asp Gln Leu Gly 2290 2295 2300	7034
act aca att tca ttt gaa aga ata aat gat gtt ctt gag cat gtc aaa Thr Thr Ile Ser Phe Glu Arg Ile Asn Asp Val Leu Glu His Val Lys 2305 2310 2315	7082
cac ttt gtt ata aat ctt att ggg gat ttt gaa gta gct gag aaa atc His Phe Val Ile Asn Leu Ile Gly Asp Phe Glu Val Ala Glu Lys Ile 2320 2325 2330	7130
aat gcc ttc aga gcc aaa gtc cat gag tta atc gag agg tat gaa gta Asn Ala Phe Arg Ala Lys Val His Glu Leu Ile Glu Arg Tyr Glu Val 2335 2340 2345 2350	7178
gac caa caa atc cag gtt tta atg gat aaa tta gta gag ttg acc cac Asp Gln Gln Ile Gln Val Leu Met Asp Lys Leu Val Glu Leu Thr His 2355 2360 2365	7226
caa tac aag ttg aag gag act att cag aag cta agc aat gtc cta caa Gln Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Ile Gln Lys Leu Ser Asn Val Leu Gln 2370 2375 2380	7274
caa gtt aag ata aaa gat tac ttt gag aaa ttg gtt gga ttt att gat Gln Val Lys Ile Lys Asp Tyr Phe Glu Lys Leu Val Gly Phe Ile Asp 2385 2390 2395	7322
gat gct gtg aag aag ctt aat gaa tta tct ttt aaa aca ttc att gaa Asp Ala Val Lys Lys Leu Asn Glu Leu Ser Phe Lys Thr Phe Ile Glu 2400 2405 2410	7370
gat gtt aac aaa ttc ctt gac atg ttg ata aag aaa tta aag tca ttt Asp Val Asn Lys Phe Leu Asp Met Leu Ile Lys Lys Leu Lys Ser Phe 2415 2420 2425 2430	7418
gat tac cac cag ttt gta gat gaa acc aat gac aaa atc cgt gag gtg Asp Tyr His Gln Phe Val Asp Glu Thr Asn Asp Lys Ile Arg Glu Val 2435 2440 2445	7466
act cag aga ctc aat ggt gaa att cag gct ctg gaa cta cca caa aaa Thr Gln Arg Leu Asn Gly Glu Ile Gln Ala Leu Glu Leu Pro Gln Lys 2450 2455 2460	7514
gct gaa gca tta aaa ctg ttt tta gag gaa acc aag gcc aca gtt gca Ala Glu Ala Leu Lys Leu Phe Leu Glu Glu Thr Lys Ala Thr Val Ala 2465 2470 2475	7562
gtg tat ctg gaa agc cta cag gac acc aaa ata acc tta atc atc aat Val Tyr Leu Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Ile Thr Leu Ile Ile Asn 2480 2485 2490	7610
tgg tta cag gag gct tta agt tca gca tct ttg gct cac atg aag gcc Trp Leu Gln Glu Ala Leu Ser Ser Ala Ser Leu Ala His Met Lys Ala 2495 2500 2505 2510	7658
aaa ttc cga gag act cta gaa gat aca cga gac cga atg tat caa atg Lys Phe Arg Glu Thr Leu Glu Asp Thr Arg Asp Arg Met Tyr Gln Met 2515 2520 2525	7706
gac att cag cag gaa ctt caa cga tac ctg tct ctg gta ggc cag gtt	7754

ES 2 420 914 T3

Asp	Ile	Gln	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Gln	Val	
		2530						2535					2540			
tat	agc	aca	ctt	gtc	acc	tac	att	tct	gat	tgg	tgg	act	ctt	gct	gct	7802
Tyr	Ser	Thr	Leu	Val	Thr	Tyr	Ile	Ser	Asp	Trp	Trp	Thr	Leu	Ala	Ala	
		2545					2550					2555				
aag	aac	ctt	act	gac	ttt	gca	gag	caa	tat	tct	atc	caa	gat	tgg	gct	7850
Lys	Asn	Leu	Thr	Asp	Phe	Ala	Glu	Gln	Tyr	Ser	Ile	Gln	Asp	Trp	Ala	
	2560					2565					2570					
aaa	cgt	atg	aaa	gca	ttg	gta	gag	caa	ggg	ttc	act	ggt	cct	gaa	atc	7898
Lys	Arg	Met	Lys	Ala	Leu	Val	Glu	Gln	Gly	Phe	Thr	Val	Pro	Glu	Ile	
	2575				2580					2585				2590		
aag	acc	atc	ctt	ggg	acc	atg	cct	gcc	ttt	gaa	gtc	agt	ctt	cag	gct	7946
Lys	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Met	Pro	Ala	Phe	Glu	Val	Ser	Leu	Gln	Ala	
			2595					2600					2605			
ctt	cag	aaa	gct	acc	ttc	cag	aca	cct	gat	ttt	ata	gtc	ccc	cta	aca	7994
Leu	Gln	Lys	Ala	Thr	Phe	Gln	Thr	Pro	Asp	Phe	Ile	Val	Pro	Leu	Thr	
		2610					2615					2620				
gat	ttg	agg	att	cca	tca	gtt	cag	ata	aac	ttc	aaa	gac	tta	aaa	aat	8042
Asp	Leu	Arg	Ile	Pro	Ser	Val	Gln	Ile	Asn	Phe	Lys	Asp	Leu	Lys	Asn	
		2625				2630						2635				
ata	aaa	atc	cca	tcc	agg	ttt	tcc	aca	cca	gaa	ttt	acc	atc	ctt	aac	8090
Ile	Lys	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Thr	Pro	Glu	Phe	Thr	Ile	Leu	Asn	
	2640					2645				2650						
acc	ttc	cac	att	cct	tcc	ttt	aca	att	gac	ttt	gtc	gaa	atg	aaa	gta	8138
Thr	Phe	His	Ile	Pro	Ser	Phe	Thr	Ile	Asp	Phe	Val	Glu	Met	Lys	Val	
	2655				2660				2665					2670		
aag	atc	atc	aga	acc	att	gac	cag	atg	cag	aac	agt	gag	ctg	cag	tgg	8186
Lys	Ile	Ile	Arg	Thr	Ile	Asp	Gln	Met	Gln	Asn	Ser	Glu	Leu	Gln	Trp	
			2675				2680						2685			
ccc	gtt	cca	gat	ata	tat	ctc	agg	gat	ctg	aag	gtg	gag	gac	att	cct	8234
Pro	Val	Pro	Asp	Ile	Tyr	Leu	Arg	Asp	Leu	Lys	Val	Glu	Asp	Ile	Pro	
		2690					2695					2700				
cta	gcg	aga	atc	acc	ctg	cca	gac	ttc	cgt	tta	cca	gaa	atc	gca	att	8282
Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Leu	Pro	Asp	Phe	Arg	Leu	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile	
		2705				2710					2715					
cca	gaa	ttc	ata	atc	cca	act	ctc	aac	ctt	aat	gat	ttt	caa	gtt	cct	8330
Pro	Glu	Phe	Ile	Ile	Pro	Thr	Leu	Asn	Leu	Asn	Asp	Phe	Gln	Val	Pro	
	2720					2725					2730					
gac	ctt	cac	ata	cca	gaa	ttc	cag	ctt	ccc	cac	atc	tca	cac	aca	att	8378
Asp	Leu	His	Ile	Pro	Glu	Phe	Gln	Leu	Pro	His	Ile	Ser	His	Thr	Ile	
	2735				2740				2745					2750		
gaa	gta	cct	act	ttt	ggc	aag	cta	tac	agt	att	ctg	aaa	atc	caa	tct	8426
Glu	Val	Pro	Thr	Phe	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ile	Gln	Ser	
			2755				2760						2765			
cct	ctt	ttc	aca	tta	gat	gca	aat	gct	gac	ata	ggg	aat	gga	acc	acc	8474
Pro	Leu	Phe	Thr	Leu	Asp	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Thr	

ES 2 420 914 T3

2770	2775	2780	
tca gca aac gaa gca ggt atc gca gct tcc atc act gcc aaa gga gag Ser Ala Asn Glu Ala Gly Ile Ala Ala Ser Ile Thr Ala Lys Gly Glu 2785 2790 2795			8522
tcc aaa tta gaa gtt ctc aat ttt gat ttt caa gca aat gca caa ctc Ser Lys Leu Glu Val Leu Asn Phe Asp Phe Gln Ala Asn Ala Gln Leu 2800 2805 2810			8570
tca aac cct aag att aat ccg ctg gct ctg aag gag tca gtg aag ttc Ser Asn Pro Lys Ile Asn Pro Leu Ala Leu Lys Glu Ser Val Lys Phe 2815 2820 2825 2830			8618
tcc agc aag tac ctg aga acg gag cat ggg agt gaa atg ctg ttt ttt Ser Ser Lys Tyr Leu Arg Thr Glu His Gly Ser Glu Met Leu Phe Phe 2835 2840 2845			8666
gga aat gct att gag gga aaa tca aac aca gtg gca agt tta cac aca Gly Asn Ala Ile Glu Gly Lys Ser Asn Thr Val Ala Ser Leu His Thr 2850 2855 2860			8714
gaa aaa aat aca ctg gag ctt agt aat gga gtg att gtc aag ata aac Glu Lys Asn Thr Leu Glu Leu Ser Asn Gly Val Ile Val Lys Ile Asn 2865 2870 2875			8762
aat cag ctt acc ctg gat agc aac act aaa tac ttc cac aaa ttg aac Asn Gln Leu Thr Leu Asp Ser Asn Thr Lys Tyr Phe His Lys Leu Asn 2880 2885 2890			8810
atc ccc aaa ctg gac ttc tct agt cag gct gac ctg cgc aac gag atc Ile Pro Lys Leu Asp Phe Ser Gln Ala Asp Leu Arg Asn Glu Ile 2895 2900 2905 2910			8858
aag aca ctg ttg aaa gct ggc cac ata gca tgg act tct tct gga aaa Lys Thr Leu Leu Lys Ala Gly His Ile Ala Trp Thr Ser Ser Gly Lys 2915 2920 2925			8906
ggg tca tgg aaa tgg gcc tgc ccc aga ttc tca gat gag gga aca cat Gly Ser Trp Lys Trp Ala Cys Pro Arg Phe Ser Asp Glu Gly Thr His 2930 2935 2940			8954
gaa tca caa att agt ttc acc ata gaa gga ccc ctc act tcc ttt gga Glu Ser Gln Ile Ser Phe Thr Ile Glu Gly Pro Leu Thr Ser Phe Gly 2945 2950 2955			9002
ctg tcc aat aag atc aat agc aaa cac cta aga gta aac caa aac ttg Leu Ser Asn Lys Ile Asn Ser Lys His Leu Arg Val Asn Gln Asn Leu 2960 2965 2970			9050
gtt tat gaa tct ggc tcc ctc aac ttt tct aaa ctt gaa att caa tca Val Tyr Glu Ser Gly Ser Leu Asn Phe Ser Lys Leu Glu Ile Gln Ser 2975 2980 2985 2990			9098
caa gtc gat tcc cag cat gtg ggc cac agt gtt cta act gct aaa ggc Gln Val Asp Ser Gln His Val Gly His Ser Val Leu Thr Ala Lys Gly 2995 3000 3005			9146
atg gca ctg ttt gga gaa ggg aag gca gag ttt act ggg agg cat gat Met Ala Leu Phe Gly Glu Gly Lys Ala Glu Phe Thr Gly Arg His Asp 3010 3015 3020			9194
gct cat tta aat gga aag gtt att gga act ttg aaa aat tct ctt ttc			9242

ES 2 420 914 T3

Ala	His	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Ile	Gly	Thr	Leu	Lys	Asn	Ser	Leu	Phe	
		3025					3030					3035				
ttt	tca	gcc	cag	cca	ttt	gag	atc	acg	gca	tcc	aca	aac	aat	gaa	ggg	9290
Phe	Ser	Ala	Gln	Pro	Phe	Glu	Ile	Thr	Ala	Ser	Thr	Asn	Asn	Glu	Gly	
		3040				3045					3050					
aat	ttg	aaa	gtt	cgt	ttt	cca	tta	agg	tta	aca	ggg	aag	ata	gac	ttc	9338
Asn	Leu	Lys	Val	Arg	Phe	Pro	Leu	Arg	Leu	Thr	Gly	Lys	Ile	Asp	Phe	
		3055				3060				3065					3070	
ctg	aat	aac	tat	gca	ctg	ttt	ctg	agt	ccc	agt	gcc	cag	caa	gca	agt	9386
Leu	Asn	Asn	Tyr	Ala	Leu	Phe	Leu	Ser	Pro	Ser	Ala	Gln	Gln	Ala	Ser	
				3075					3080					3085		
tgg	caa	gta	agt	gct	agg	ttc	aat	cag	tat	aag	tac	aac	caa	aat	ttc	9434
Trp	Gln	Val	Ser	Ala	Arg	Phe	Asn	Gln	Tyr	Lys	Tyr	Asn	Gln	Asn	Phe	
			3090					3095					3100			
tct	gct	gga	aac	aac	gag	aac	att	atg	gag	gcc	cat	gta	gga	ata	aat	9482
Ser	Ala	Gly	Asn	Asn	Glu	Asn	Ile	Met	Glu	Ala	His	Val	Gly	Ile	Asn	
		3105					3110					3115				
gga	gaa	gca	aat	ctg	gat	ttc	tta	aac	att	cct	tta	aca	att	cct	gaa	9530
Gly	Glu	Ala	Asn	Leu	Asp	Phe	Leu	Asn	Ile	Pro	Leu	Thr	Ile	Pro	Glu	
		3120				3125					3130					
atg	cgt	cta	cct	tac	aca	ata	atc	aca	act	cct	cca	ctg	aaa	gat	ttc	9578
Met	Arg	Leu	Pro	Tyr	Thr	Ile	Ile	Thr	Thr	Pro	Pro	Leu	Lys	Asp	Phe	
					3140					3145					3150	
tct	cta	tgg	gaa	aaa	aca	ggc	ttg	aag	gaa	ttc	ttg	aaa	acg	aca	aag	9626
Ser	Leu	Trp	Glu	Lys	Thr	Gly	Leu	Lys	Glu	Phe	Leu	Lys	Thr	Thr	Lys	
				3155					3160					3165		
caa	tca	ttt	gat	tta	agt	gta	aaa	gct	cag	tat	aag	aaa	aac	aaa	cac	9674
Gln	Ser	Phe	Asp	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Gln	Tyr	Lys	Lys	Asn	Lys	His	
			3170					3175					3180			
agg	cat	tcc	atc	aca	aat	cct	ttg	gct	gtg	ctt	tgt	gag	ttt	atc	agt	9722
Arg	His	Ser	Ile	Thr	Asn	Pro	Leu	Ala	Val	Leu	Cys	Glu	Phe	Ile	Ser	
			3185				3190					3195				
cag	agc	atc	aaa	tcc	ttt	gac	agg	cat	ttt	gaa	aaa	aac	aga	aac	aat	9770
Gln	Ser	Ile	Lys	Ser	Phe	Asp	Arg	His	Phe	Glu	Lys	Asn	Arg	Asn	Asn	
		3200				3205					3210					
gca	tta	gat	ttt	gtc	acc	aaa	tcc	tat	aat	gaa	aca	aaa	att	aag	ttt	9818
Ala	Leu	Asp	Phe	Val	Thr	Lys	Ser	Tyr	Asn	Glu	Thr	Lys	Ile	Lys	Phe	
		3215			3220					3225				3230		
gat	aag	tac	aaa	gct	gaa	aaa	tct	cac	gac	gag	ctc	ccc	agg	acc	ttt	9866
Asp	Lys	Tyr	Lys	Ala	Glu	Lys	Ser	His	Asp	Glu	Leu	Pro	Arg	Thr	Phe	
				3235					3240					3245		
caa	att	cct	gga	tac	act	gtt	cca	gtt	gtc	aat	gtt	gaa	gtg	tct	cca	9914
Gln	Ile	Pro	Gly	Tyr	Thr	Val	Pro	Val	Val	Asn	Val	Glu	Val	Ser	Pro	
			3250					3255					3260			
ttc	acc	ata	gag	atg	tcg	gca	ttc	ggc	tat	gtg	ttc	cca	aaa	gca	gtc	9962
Phe	Thr	Ile	Glu	Met	Ser	Ala	Phe	Gly	Tyr	Val	Phe	Pro	Lys	Ala	Val	

ES 2 420 914 T3

3265	3270	3275	
agc atg cct agt ttc tcc atc cta ggt tct gac gtc cgt gtg cct tca Ser Met Pro Ser Phe Ser Ile Leu Gly Ser Asp Val Arg Val Pro Ser 3280 3285 3290			10010
tac aca tta atc ctg cca tca tta gag ctg cca gtc ctt cat gtc cct Tyr Thr Leu Ile Leu Pro Ser Leu Glu Leu Phe Thr Leu His Val Pro 3295 3300 3305 3310			10058
aga aat ctc aag ctt tct ctt cca cat ttc aag gaa ttg tgt acc ata Arg Asn Leu Lys Leu Ser Leu Pro His Phe Lys Glu Leu Cys Thr Ile 3315 3320 3325			10106
agc cat att ttt att cct gcc atg ggc aat att acc tat gat ttc tcc Ser His Ile Phe Ile Pro Ala Met Gly Asn Ile Thr Tyr Asp Phe Ser 3330 3335 3340			10154
ttt aaa tca agt gtc atc aca ctg aat acc aat gct gaa ctt ttt aac Phe Lys Ser Ser Val Ile Thr Leu Asn Thr Asn Ala Glu Leu Phe Asn 3345 3350 3355			10202
cag tca gat att gtt gct cat ctc ctt tct tca tct tca tct gtc att Gln Ser Asp Ile Val Ala His Leu Leu Ser Ser Ser Ser Val Ile 3360 3365 3370			10250
gat gca ctg cag tac aaa tta gag ggc acc aca aga ttg aca aga aaa Asp Ala Leu Gln Tyr Lys Leu Glu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Arg Lys 3375 3380 3385 3390			10298
agg gga ttg aag tta gcc aca gct ctg tct ctg agc aac aaa ttt gtg Arg Gly Leu Lys Leu Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn Lys Phe Val 3395 3400 3405			10346
gag ggt agt cat aac agt act gtg agc tta acc acg aaa aat atg gaa Glu Gly Ser His Asn Ser Thr Val Ser Leu Thr Thr Lys Asn Met Glu 3410 3415 3420			10394
gtg tca gtg gca aaa acc aca aaa gcc gaa att cca att ttg aga atg Val Ser Val Ala Lys Thr Thr Lys Ala Glu Ile Pro Ile Leu Arg Met 3425 3430 3435			10442
aat ttc aag caa gaa ctt aat gga aat acc aag tca aaa cct act gtc Asn Phe Lys Gln Glu Leu Asn Gly Asn Thr Lys Ser Lys Pro Thr Val 3440 3445 3450			10490
tct tcc tcc atg gaa ttt aag tat gat ttc aat tct tca atg ctg tac Ser Ser Ser Met Glu Phe Lys Tyr Asp Phe Asn Ser Ser Met Leu Tyr 3455 3460 3465 3470			10538
tct acc gct aaa gga gca gtt gac cac aag ctt agc ttg gaa agc ctc Ser Thr Ala Lys Gly Ala Val Asp His Lys Leu Ser Leu Glu Ser Leu 3475 3480 3485			10586
acc tct tac ttt tcc att gag tca tct acc aaa gga gat gtc aag ggt Thr Ser Tyr Phe Ser Ile Glu Ser Ser Thr Lys Gly Asp Val Lys Gly 3490 3495 3500			10634
tcg gtt ctt tct cgg gaa tat tca gga act att gct agt gag gcc aac Ser Val Leu Ser Arg Glu Tyr Ser Gly Thr Ile Ala Ser Glu Ala Asn 3505 3510 3515			10682
act tac ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag ggc			10730

ES 2 420 914 T3

Thr	Tyr	Leu	Asn	Ser	Lys	Ser	Thr	Arg	Ser	Ser	Val	Lys	Leu	Gln	Gly		
3520						3525					3530						
act	tcc	aaa	att	gat	gat	atc	tgg	aac	ctt	gaa	gta	aaa	gaa	aat	ttt	10778	
Thr	Ser	Lys	Ile	Asp	Asp	Ile	Trp	Asn	Leu	Glu	Val	Lys	Glu	Asn	Phe		
3535					3540					3545					3550		
gct	gga	gaa	gcc	aca	ctc	caa	cgc	ata	tat	tcc	ctc	tgg	gag	cac	agt	10826	
Ala	Gly	Glu	Ala	Thr	Leu	Gln	Arg	Ile	Tyr	Ser	Leu	Trp	Glu	His	Ser		
				3555					3560					3565			
acg	aaa	aac	cac	tta	cag	cta	gag	ggc	ctc	ttt	ttc	acc	aac	gga	gaa	10874	
Thr	Lys	Asn	His	Leu	Gln	Leu	Glu	Gly	Leu	Phe	Phe	Thr	Asn	Gly	Glu		
			3570					3575					3580				
cat	aca	agc	aaa	gcc	acc	ctg	gaa	ctc	tct	cca	tgg	caa	atg	tca	gct	10922	
His	Thr	Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Glu	Leu	Ser	Pro	Trp	Gln	Met	Ser	Ala		
			3585				3590					3595					
ctt	gtt	cag	gtc	cat	gca	agt	cag	ccc	agt	tcc	ttc	cat	gat	ttc	cct	10970	
Leu	Val	Gln	Val	His	Ala	Ser	Gln	Pro	Ser	Ser	Phe	His	Asp	Phe	Pro		
	3600					3605				3610							
gac	ctt	ggc	cag	gaa	gtg	gcc	ctg	aat	gct	aac	act	aag	aac	cag	aag	11018	
Asp	Leu	Gly	Gln	Glu	Val	Ala	Leu	Asn	Ala	Asn	Thr	Lys	Asn	Gln	Lys		
3615					3620				3625					3630			
atc	aga	tgg	aaa	aat	gaa	gtc	cgg	att	cat	tct	ggg	tct	ttc	cag	agc	11066	
Ile	Arg	Trp	Lys	Asn	Glu	Val	Arg	Ile	His	Ser	Gly	Ser	Phe	Gln	Ser		
				3635				3640						3645			
cag	gtc	gag	ctt	tcc	aat	gac	caa	gaa	aag	gca	cac	ctt	gac	att	gca	11114	
Gln	Val	Glu	Leu	Ser	Asn	Asp	Gln	Glu	Lys	Ala	His	Leu	Asp	Ile	Ala		
			3650				3655						3660				
gga	tcc	tta	gaa	gga	cac	cta	agg	ttc	ctc	aaa	aat	atc	atc	cta	cca	11162	
Gly	Ser	Leu	Glu	Gly	His	Leu	Arg	Phe	Leu	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu	Pro		
		3665				3670					3675						
gtc	tat	gac	aag	agc	tta	tgg	gat	ttc	cta	aag	ctg	gat	gta	acc	acc	11210	
Val	Tyr	Asp	Lys	Ser	Leu	Trp	Asp	Phe	Leu	Lys	Leu	Asp	Val	Thr	Thr		
	3680					3685					3690						
agc	att	ggc	agg	aga	cag	cat	ctt	cgt	gtt	tca	act	gcc	ttt	gtg	tac	11258	
Ser	Ile	Gly	Arg	Arg	Gln	His	Leu	Arg	Val	Ser	Thr	Ala	Phe	Val	Tyr		
3695					3700				3705					3710			
acc	aaa	aac	ccc	aat	ggc	tat	tca	ttc	tcc	atc	cct	gta	aaa	gtt	ttg	11306	
Thr	Lys	Asn	Pro	Asn	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ile	Pro	Val	Lys	Val	Leu		
				3715				3720					3725				
gct	gat	aaa	ttc	att	act	cct	ggg	ctg	aaa	cta	aat	gat	cta	aat	tca	11354	
Ala	Asp	Lys	Phe	Ile	Thr	Pro	Gly	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu	Asn	Ser		
			3730				3735					3740					
gtt	ctt	gtc	atg	cct	acg	ttc	cat	gtc	cca	ttt	aca	gat	ctt	cag	gtt	11402	
Val	Leu	Val	Met	Pro	Thr	Phe	His	Val	Pro	Phe	Thr	Asp	Leu	Gln	Val		
		3745					3750					3755					

ES 2 420 914 T3

cca tcg tgc aaa ctt gac ttc aga gaa ata caa atc tat aag aag ctg Pro Ser Cys Lys Leu Asp Phe Arg Glu Ile Gln Ile Tyr Lys Lys Leu 3760 3765 3770	11450
aga act tca tca ttt gcc ctc aac cta cca aca ctc ccc gag gta aaa Arg Thr Ser Ser Phe Ala Leu Asn Leu Pro Thr Leu Pro Glu Val Lys 3775 3780 3785 3790	11498
ttc cct gaa gtt gat gtg tta aca aaa tat tct caa cca gaa gac tcc Phe Pro Glu Val Asp Val Leu Thr Lys Tyr Ser Gln Pro Glu Asp Ser 3795 3800 3805	11546
ttg att ccc ttt ttt gag ata acc gtg cct gaa tct cag tta act gtg Leu Ile Pro Phe Phe Glu Ile Thr Val Pro Glu Ser Gln Leu Thr Val 3810 3815 3820	11594
tcc cag ttc acg ctt cca aaa agt gtt tca gat ggc att gct gct ttg Ser Gln Phe Thr Leu Pro Lys Ser Val Ser Asp Gly Ile Ala Ala Leu 3825 3830 3835	11642
gat cta aat gca gta gcc aac aag atc gca gac ttt gag ttg ccc acc Asp Leu Asn Ala Val Ala Asn Lys Ile Ala Asp Phe Glu Leu Pro Thr 3840 3845 3850	11690
atc atc gtg cct gag cag acc att gag att ccc tcc att aag ttc tct Ile Ile Val Pro Glu Gln Thr Ile Glu Ile Pro Ser Ile Lys Phe Ser 3855 3860 3865 3870	11738
gta cct gct gga att gtc att cct tcc ttt caa gca ctg act gca cgc Val Pro Ala Gly Ile Val Ile Pro Ser Phe Gln Ala Leu Thr Ala Arg 3875 3880 3885	11786
ttt gag gta gac tct ccc gtg tat aat gcc act tgg agt gcc agt ttg Phe Glu Val Asp Ser Pro Val Tyr Asn Ala Thr Trp Ser Ala Ser Leu 3890 3895 3900	11834
aaa aac aaa gca gat tat gtt gaa aca gtc ctg gat tcc aca tgc agc Lys Asn Lys Ala Asp Tyr Val Glu Thr Val Leu Asp Ser Thr Cys Ser 3905 3910 3915	11882
tca acc gta cag ttc cta gaa tat gaa cta aat gtt ttg gga aca cac Ser Thr Val Gln Phe Leu Glu Tyr Glu Leu Asn Val Leu Gly Thr His 3920 3925 3930	11930
aaa atc gaa gat ggt acg tta gcc tct aag act aaa gga aca ctt gca Lys Ile Glu Asp Gly Thr Leu Ala Ser Lys Thr Lys Gly Thr Leu Ala 3935 3940 3945 3950	11978
cac cgt gac ttc agt gca gaa tat gaa gaa gat ggc aaa ttt gaa gga His Arg Asp Phe Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Lys Phe Glu Gly 3955 3960 3965	12026
ctt cag gaa tgg gaa gga aaa gcg cac ctc aat atc aaa agc cca gcg Leu Gln Glu Trp Glu Gly Lys Ala His Leu Asn Ile Lys Ser Pro Ala 3970 3975 3980	12074
ttc acc gat ctc cat ctg cgc tac cag aaa gac aag aaa ggc atc tcc Phe Thr Asp Leu His Leu Arg Tyr Gln Lys Asp Lys Lys Gly Ile Ser 3985 3990 3995	12122
acc tca gca gcc tcc cca gcc gta gcc acc gtg gcc atg gat atg gat Thr Ser Ala Ala Ser Pro Ala Val Gly Thr Val Gly Met Asp Met Asp	12170

ES 2 420 914 T3

4000	4005	4010	
gaa gat gac gac ttt tct aaa tgg aac ttc tac tac agc cct cag tcc Glu Asp Asp Asp Phe Ser Lys Trp Asn Phe Tyr Tyr Ser Pro Gln Ser 4015 4020 4025 4030			12218
tct cca gat aaa aaa ctc acc ata ttc aaa act gag ttg agg gtc cgg Ser Pro Asp Lys Lys Leu Thr Ile Phe Lys Thr Glu Leu Arg Val Arg 4035 4040 4045			12266
gaa tct gat gag gaa act cag atc aaa gtt aat tgg gaa gaa gag gca Glu Ser Asp Glu Glu Thr Gln Ile Lys Val Asn Trp Glu Glu Glu Ala 4050 4055 4060			12314
gct tct ggc ttg cta acc tct ctg aaa gac aac gtg ccc aag gcc aca Ala Ser Gly Leu Leu Thr Ser Lys Asp Asn Val Pro Lys Ala Thr 4065 4070 4075			12362
ggg gtc ctt tat gat tat gtc aac aag tac cac tgg gaa cac aca ggg Gly Val Leu Tyr Asp Tyr Val Asn Lys Tyr His Trp Glu His Thr Gly 4080 4085 4090			12410
ctc acc ctg aga gaa gtg tct tca aag ctg aga aga aat ctg cag aac Leu Thr Leu Arg Glu Val Ser Ser Lys Leu Arg Arg Asn Leu Gln Asn 4095 4100 4105 4110			12458
aat gct gag tgg gtt tat caa ggg gcc att agg caa att gat gat atc Asn Ala Glu Trp Val Tyr Gln Gly Ala Ile Arg Gln Ile Asp Asp Ile 4115 4120 4125			12506
gac gtg agg ttc cag aaa gca gcc agt ggc acc act ggg acc tac caa Asp Val Arg Phe Gln Lys Ala Ala Ser Gly Thr Thr Gly Thr Tyr Gln 4130 4135 4140			12554
gag tgg aag gac aag gcc cag aat ctg tac cag gaa ctg ttg act cag Glu Trp Lys Asp Lys Ala Gln Asn Leu Tyr Gln Glu Leu Leu Thr Gln 4145 4150 4155			12602
gaa ggc caa gcc agt ttc cag gga ctc aag gat aac gtg ttt gat ggc Glu Gly Gln Ala Ser Phe Gln Gly Leu Lys Asp Asn Val Phe Asp Gly 4160 4165 4170			12650
ttg gta cga gtt act caa aaa ttc cat atg aaa gtc aag cat ctg att Leu Val Arg Val Thr Gln Lys Phe His Met Lys Val Lys His Leu Ile 4175 4180 4185 4190			12698
gac tca ctc att gat ttt ctg aac ttc ccc aga ttc cag ttt ccg ggg Asp Ser Leu Ile Asp Phe Leu Asn Phe Pro Arg Phe Gln Phe Pro Gly 4195 4200 4205			12746
aaa cct ggg ata tac act agg gag gaa ctt tgc act atg ttc ata agg Lys Pro Gly Ile Tyr Thr Arg Glu Glu Leu Cys Thr Met Phe Ile Arg 4210 4215 4220			12794
gag gta ggg acg gta ctg tcc cag gta tat tcg aaa gtc cat aat ggt Glu Val Gly Thr Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Val His Asn Gly 4225 4230 4235			12842
tca gaa ata ctg ttt tcc tat ttc caa gac cta gtg att aca ctt cct Ser Glu Ile Leu Phe Ser Tyr Phe Gln Asp Leu Val Ile Thr Leu Pro 4240 4245 4250			12890
ttc gag tta agg aaa cat aaa cta ata gat gta atc tcg atg tat agg			12938

ES 2 420 914 T3

Phe Glu Leu Arg Lys His Lys Leu Ile Asp Val Ile Ser Met Tyr Arg 4255 4260 4265 4270	
gaa ctg ttg aaa gat tta tca aaa gaa gcc caa gag gta ttt aaa gcc Glu Leu Leu Lys Asp Leu Ser Lys Glu Ala Gln Glu Val Phe Lys Ala 4275 4280 4285	12986
att cag tct ctc aag acc aca gag gtg cta cgt aat ctt cag gac ctt Ile Gln Ser Leu Lys Thr Thr Glu Val Leu Arg Asn Leu Gln Asp Leu 4290 4295 4300	13034
tta caa ttc att ttc caa cta ata gaa gat aac att aaa cag ctg aaa Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Ile Glu Asp Asn Ile Lys Gln Leu Lys 4305 4310 4315	13082
gag atg aaa ttt act tat ctt att aat tat atc caa gat gag atc aac Glu Met Lys Phe Thr Tyr Leu Ile Asn Tyr Ile Gln Asp Glu Ile Asn 4320 4325 4330	13130
aca atc ttc aat gat tat atc cca tat gtt ttt aaa ttg ttg aaa gaa Thr Ile Phe Asn Asp Tyr Ile Pro Tyr Val Phe Lys Leu Leu Lys Glu 4335 4340 4345 4350	13178
aac cta tgc ctt aat ctt cat aag ttc aat gaa ttt att caa aac gag Asn Leu Cys Leu Asn Leu His Lys Phe Asn Glu Phe Ile Gln Asn Glu 4355 4360 4365	13226
ctt cag gaa gct tct caa gag tta cag cag atc cat caa tac att atg Leu Gln Glu Ala Ser Gln Glu Leu Gln Gln Ile His Gln Tyr Ile Met 4370 4375 4380	13274
gcc ctt cgt gaa gaa tat ttt gat cca agt ata gtt ggc tgg aca gtg Ala Leu Arg Glu Glu Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Val Gly Trp Thr Val 4385 4390 4395	13322
aaa tat tat gaa ctt gaa gaa aag ata gtc agt ctg atc aag aac ctg Lys Tyr Tyr Glu Leu Glu Glu Lys Ile Val Ser Leu Ile Lys Asn Leu 4400 4405 4410	13370
tta gtt gct ctt aag gac ttc cat tct gaa tat att gtc agt gcc tct Leu Val Ala Leu Lys Asp Phe His Ser Glu Tyr Ile Val Ser Ala Ser 4415 4420 4425 4430	13418
aac ttt act tcc caa ctc tca agt caa gtt gag caa ttt ctg cac aga Asn Phe Thr Ser Gln Leu Ser Ser Gln Val Glu Gln Phe Leu His Arg 4435 4440 4445	13466
aat att cag gaa tat ctt agc atc ctt acc gat cca gat gga aaa ggg Asn Ile Gln Glu Tyr Leu Ser Ile Leu Thr Asp Pro Asp Gly Lys Gly 4450 4455 4460	13514
aaa gag aag att gca gag ctt tct gcc act gct cag gaa ata att aaa Lys Glu Lys Ile Ala Glu Leu Ser Ala Thr Ala Gln Glu Ile Ile Lys 4465 4470 4475	13562
agc cag gcc att gcg acg aag aaa ata att tct gat tac cac cag cag Ser Gln Ala Ile Ala Thr Lys Lys Ile Ile Ser Asp Tyr His Gln Gln 4480 4485 4490	13610
ttt aga tat aaa ctg caa gat ttt tca gac caa ctc tct gat tac tat Phe Arg Tyr Lys Leu Gln Asp Phe Ser Asp Gln Leu Ser Asp Tyr Tyr	13658

ES 2 420 914 T3

	4495	4500	4505	4510	
	gaa aaa ttt att gct gaa tcc aaa aga ttg att gac ctg tcc att caa				13706
	Glu Lys Phe Ile Ala Glu Ser Lys Arg Leu Ile Asp Leu Ser Ile Gln				
		4515	4520	4525	
	aac tac cac aca ttt ctg ata tac atc acg gag tta ctg aaa aag ctg				13754
	Asn Tyr His Thr Phe Leu Ile Tyr Ile Thr Glu Leu Leu Lys Lys Leu				
		4530	4535	4540	
	caa tca acc aca gtc atg aac ccc tac atg aag ctt gct cca gga gaa				13802
	Gln Ser Thr Thr Val Met Asn Pro Tyr Met Lys Leu Ala Pro Gly Glu				
		4545	4550	4555	
	ctt act atc atc ctc taa ttttttaaaa gaaatcttca tttattcttc				13850
	Leu Thr Ile Ile Leu *				
		4560			
	ttttccaatt gaactttcac atagcacaga aaaaattcaa actgcctata ttgataaaac				13910
	catacagtga gccagccttg cagtaggcag tagactataa gcagaagcac atatgaactg				13970
	gacctgcacc aaagctggca ccagggctcg gaaggtctct gaactcagaa ggatggcatt				14030
	ttttgcaagt taaagaaaat caggatctga gttattttgc taaacttggg ggaggaggaa				14090
	caaataaatg gagtctttat tgtgtatcat a				14121
	<210> 4				
	<211> 21				
5	<212> ADN				
	<213> Secuencia Artificial				
	<220>				
	<223> PCR Cebador				
10	<400> 4				
	tgctaaaggc acatatggcc t				21
15	<210> 5				
	<211> 23				
	<212> ADN				
	<213> Secuencia Artificial				
20	<220>				
	<223> Cebador PCR				
	<400> 5				
25	ctcaggttg actctccatt gag				23
	<210> 6				
	<211> 28				
	<212> ADN				
30	<213> Secuencia Artificial				
	<220>				
	<223> Sonda PCR				
35	<400> 6				
	ctgtcagag ggatcctaac actggccg				28
40	<210> 7				
	<211> 19				
	<212> ADN				
	<213> Secuencia Artificial				

<220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 7
 5 gaaggtgaag gtcggagtc 19
 <210> 8
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador PCR
 15 <400> 8
 gaagatggtg atgggatttc 20
 20 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sonda PCR
 <400> 9
 30 caagcttccc gttctcagcc 20
 <210> 10
 <211> 2354
 <212> ADN
 35 <213> Mus musculus
 <400> 10
 gaattccaac ttcctcacct ctcacataca attgaaatac ctgcttttgg caaactgcat 60
 agcatcctta agatccaatc tcctctcttt atattagatg ctaatgccaa catacagaat 120
 gtaacaactt caggaacaa agcagagatt gtggcttctg tcaactgtaa aggagagtcc 180
 caatttgaag ctctcaattt tgattttcaa gcacaagctc aattcctgga gttaaatcct 240
 catctccag tcctgaagga atccatgaac ttctccagta agcatgtgag aatggagcat 300
 gagggtgaga tagtatttga tggaaaggcc attgagggga aatcagacac agtcgcaagt 360
 ttacacacag agaaaaatga agtagagttt aataatggta tgactgtcaa agtaaacaat 420
 cagctcacc cttgacagtca cacaaagtac ttccacaagt tgagtgttcc taggctggac 480
 ttctccagta aggttctct taataatgaa atcaagacac tattagaagc tggacatgtg 540
 gcattgacat cttcaggagc aggggtcatgg aactgggcct gtcccaactt ctcggatgaa 600
 ggcatacatt cgtcccaaat tagctttact gtggatggtc ccattgcttt tgttggacta 660
 tccaataaca taaatggcaa acacttacgg gtcacccaaa aactgactta tgaatctggc 720
 ttctctcaact attctaagtt tgaagttgag tcaaaagttg aatctcagca cgtgggctcc 780
 40

ES 2 420 914 T3

agcattctaa cagccaatgg tcgggcactg ctcaaggacg caaaggcaga aatgactggg 840
 gagcacaatg ccaacttaaa tggaaaagtt attggaactt tgaaaaattc tctcttcttt 900
 tcagcacaac catttgagat tactgcatcc acaataatg aaggaaattt gaaagtgggt 960
 tttccactaa agctgactgg gaaaatagac ttctgaata actatgcatt gtttctgagt 1020
 ccccggtccc aacaagcaag ctggcaagcg agtaccagat tcaatcagta caaatacaat 1080
 caaaactttt ctgctataaa caatgaacac aacatagaag ccagtatagg aatgaatgga 1140
 gatgccaaac tggatttctt aaacatacct ttaacaattc ctgaaattaa cttgccttac 1200
 acggagttca aaactccctt actgaaggat ttctccatat gggaagaaac aggcttgaaa 1260
 gaatttttga agacaacaaa gcaatcattt gatttgagtg taaaggctca atataaaaag 1320
 aacagtgaca agcattccat tgttgtccct ctgggtatgt tttatgaatt tattctcaac 1380
 aatgtcaatt cgtgggacag aaaatttgag aaagtcagaa acaatgcttt acattttctt 1440
 accacctcct ataatgaagc aaaaattaaag gttgataagt aaaaaactga aaattccctt 1500
 aatcagccct ctgggacctt tcaaaatcat ggctacacta tcccagttgt caacattgaa 1560
 gtatctccat ttgctgtaga gacactggct tccaggcatg tgatccccac agcaataagc 1620
 accccaagtg tcacaatccc tggtcctaac atcatggtgc cttcatacaa gttagtgtctg 1680
 ccacccctgg agttgccagt ttccatggt cctgggaatc tattcaagtt tttcctccca 1740
 gatttcaagg gattcaacac tattgacaat atttatattc cagccatggg caactttacc 1800
 tatgactttt cttttaaatc aagtgtcatc acactgaata ccaatgctgg actttataac 1860
 caatcagata tcgttgccca tttcctttct tctcttcat ttgtcactga cgccctgcag 1920
 taaaaattag agggaacatc acgtctgatg cgaaaaaggg gattgaaact agccacagct 1980
 gtctctctaa ctaacaaatt tgtaaagggc agtcatgaca gcaccattag tttaaccaag 2040
 aaaaacatgg aagcatcagt gagaacaact gccaacctcc atgctcccat attctcaatg 2100
 aacttcaagc aggaacttaa tggaaatacc aagtcaaac ccactgtttc atcatccatt 2160
 gaactaaact atgacttcaa ttccctcaaag ctgcactcta ctgcaacagg aggcattgat 2220
 cacaagttca gcttagaaaag tctcacttcc tacttttcca ttgagtcatt caccaaagga 2280
 aatatcaaga gttccttctt ttctcaggaa tattcaggaa gtgttgccaa tgaagccaat 2340
 gtatatctga attc 2354

<210> 11

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

10

<400> 11

cgtagggctcc agcattcta 19

15 <210> 12

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Cebador PCR
 <400> 12
 5 agtcatttct gcctttgcgt c 21
 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda PCR
 15 <400> 13
 ccaatggtcg ggcactgctc aa 22
 <210> 14
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Cebador PCR
 <400> 14
 ggcaaattca acggcacagt 20
 30 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Cebador PCR
 <400> 15
 40 ggtgtctcgct cctggaagat 20
 <210> 16
 <211> 27
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sonda PCR
 50 <400> 16
 aaggccgaga atgggaagct tgtcatc 27
 55 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 17
 65 ccgcaggtcc cgttggaat 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 18
 10 accgagaagg gcactcagcc 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 19
 gcctcggcct cgcggccctg 20
 25 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 20
 35 tccatcgcca gctgcggtgg 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 21
 cagcgccagc agcgccagca 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 22
 gcccgccagc agcagcagca 20
 60
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 23
 5 cttgaatcag cagtcccagg 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 24
 cttcagcaag gcttgcct 20
 <210> 25
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 25
 tttctgtgc cacattgcc 20
 30 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 26
 40 ggaagagggtg ttgctcctg 20
 <210> 27
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 27
 tgtgtacca tccatactt 20
 55 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 28
 65 tcaaagcga ggccatctt 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 29
 10 ggacacctca atcagctgtg 20
 <210> 30
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20 <400> 30
 tcagggccac caggtaggtg 20
 25 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 31
 35 gtaatcttca tccccagtc 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 32
 tgctccatgg ttggcccat 20
 <210> 33
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 33
 gcagccagtc gcttatctcc 20
 60 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 34

5 gtatagccaa agtgggtccac 20

<210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido antisentido

15 <400> 35

cccaggagct ggaggtcatg 20

<210> 36
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 36

ttgagccctt cctgatgacc 20

30 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 37

40 atctggaccc cactcctagc 20

<210> 38
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido antisentido

50 <400> 38

cagacccgac tcgtggaaga 20

55 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 39

65 gccctcagta gattcatcat 20

<210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 40
 10 gcatgccac cctctggaa 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 41
 aaccacgtg ccgaaagtc 20
 25 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 42
 35 actccagat gcctctgaa 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 43
 atgtgtaac gagccgaag 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 44
 ggcgtagaga cccatcacat 20
 60
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 45
 5 gtgttaggat ccctctgaca 20
 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 46
 cccagtgata gctctgtgag 20
 <210> 47
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 47
 atttcagcat atgagcccat 20
 30 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 48
 40 ccctgaacct tagcaacagt 20
 <210> 49
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 49
 gctgaagcca gcccagcgat 20
 55 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 50
 65 acagctgccc agtatgttct 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 51
 10
 cccaataaga ttataacaa 20
 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 52
 tggcctacca gagacaggta 20
 25
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 53
 35
 tcatacgttt agcccaatct 20
 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 54
 gcatggtccc aaggatggtc 20
 50
 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 55
 60
 agtgatggaa gctgcgatac 20
 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 56

5 atgagcatca tgctcccag 20

<210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido antisentido

15 <400> 57

gaacacatag ccgaatgccg 20

<210> 58
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 58

gtgggtccct ctaattgta 20

30 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 59

40 cccgagaaag aaccgaaccc 20

<210> 60
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido antisentido

50 <400> 60

tgccctgcag cttcactgaa 20

55 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 61

65 gaaatcccat aagctcttgt 20

<210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 62
 10
 agaagctgcc tcttctccc 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 63
 tcagggtgag ccctgtgtgt 20
 25
 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 64
 35
 ctaatggccc cttgataaac 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 65
 acgttatcct tgagtcctg 20
 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 66
 tatatcccag gtttcccgg 20
 60
 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 67

5 acctgggaca gtaccgtccc 20

 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

15 <400> 68

 ctgcctactg caaggctggc 20

 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 69

 agagaccttc cgagccctgg 20

30 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 70

40 atgatacaca ataaagactc 20

 <210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

50 <400> 71

 attgtatgtg agaggtgagg 20

55 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 72

65 gaggagattg gatcttaagg 20

<210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 73
 10
 ctcaaattg ggactctct 20
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 74
 tccaggaatt gagctgtgc 20
 25
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 75
 35
 ttcaggactg gaggatgagg 20
 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 76
 tctcaccctc atgctccatt 20
 <210> 77
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 77
 tgactgtcaa gggtagctg 20
 60
 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 78
 5 gtccagccta ggaacactca 20
 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 79
 atgtcaatgc cacatgtcca 20
 <210> 80
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 80
 ttcacccgag aagttgggac 20
 30 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 81
 40 atttgggacg aatgtatgcc 20
 <210> 82
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 82
 agttgaggaa gccagattca 20
 55 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 83
 65 ttcccagtc gcttagtg 20

<210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 84
 10 agcttgcttg ttgggcacgg 20
 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 85
 cctatactgg cttctatgtt 20
 25 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 86
 35 tgaactccgt gtaaggcaag 20
 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 87
 gagaaatcct tcagtaaggg 20
 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 88
 caatggaatg cttgtcactg 20
 60
 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 89
 5 gcttcattat aggaggtggt 20
 <210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 90
 acaactggga tagtgtagcc 20
 <210> 91
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 91
 gttaggacca gggattgtga 20
 30 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 92
 40 accatggaaa actggcaact 20
 <210> 93
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 93
 tgggaggaaa aacttgaata 20
 55 <210> 94
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 94
 65 tgggcaacga tatctgattg 20

<210> 95
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 95
 10
 ctgcagggcg tcagtgaaa 20
 <210> 96
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 96
 gcatcagacg tgatgtccc 20
 25
 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 97
 35
 cttggttaaa ctaatggtgc 20
 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 98
 atgggagcat ggaggttgc 20
 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 99
 aatggatgat gaaacagtgg 20
 60
 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 100
 5 atcaatgcct cctgttcag 20
 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 101
 ggaagtgaga cttctaagc 20
 <210> 102
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 102
 aggaaggaac tcttgatatt 20
 30 <210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 103
 40 attggcttca ttggcaacac 20
 <210> 104
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 104
 aggtgaggaa gttgaattc 20
 55 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 105
 65 ttgtccctg aagttgtac 20

<210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 106
 10 gttcatggat tccttcagga 20
 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 107
 atgctccatt ctcacatgct 20
 25 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 108
 35 tgcgactgtg tctgattcc 20
 <210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 109
 gtccctgaag atgtcaatgc 20
 <210> 110
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 110
 aggcccagtt ccatgaccct 20
 60
 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 111
 5 ggagcccacg tgctgagatt 20
 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 112
 cgtccttgag cagtgccga 20
 <210> 113
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 113
 cccatatgga gaaatccttc 20
 30 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 114
 40 catgcctgga agccagtgtc 20
 <210> 115
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 115
 gtgttgaatc ccttgaaatc 20
 55 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 116
 65 ggtaaagttg cccatggctg 20

<210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 117
 10 gttataaagt ccagcattgg 20
 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 118
 catcagacgt gatgttcct 20
 25 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 119
 35 tggctagttt caatcccctt 20
 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 120
 ctgtcatgac tgccctttac 20
 <210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 121
 gcttgaagtt cattgagaat 20
 60
 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 122
 5 ttctgagaa aggaaggaac 20
 <210> 123
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 123
 tcagatatac attggcttca 20
 <210> 124
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 124
 ttctcttcg gccctggcgc 20
 30 <210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 125
 40 ctccactgga actctcagcc 20
 <210> 126
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 126
 cctccagctc aaccttgacg 20
 55 <210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 127
 65 gggttgaagc catacacctc 20

<210> 128
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 128
 10 ccagcttgag ctcatacctg 20
 <210> 129
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 129
 ccctcttgat gttcaggatg 20
 25 <210> 130
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 130
 35 gagcagtttc catacacggt 20
 <210> 131
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 131
 cccttcctcg tcttgacggt 20
 <210> 132
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 132
 ttgaagcgat cacactgccc 20
 60 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 133
 5 gccttgatg agagcaagtg 20
 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 134
 tcctcttagc gtccagtgtg 20
 <210> 135
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 135
 cctctcagct cagtaaccag 20
 30 <210> 136
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 136
 40 gcactgaggc tgtccacact 20
 <210> 137
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 137
 cgctgatccc tcgcatgtt 20
 55 <210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 138
 65 gttgaccgcg tggctcagcg 20

<210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 139
 10
 gcagctcctg ggtccctgta 20
 <210> 140
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 140
 cccatggtag aatttgaca 20
 25
 <210> 141
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 141
 35
 aatctcgatg aggtcagctg 20
 <210> 142
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 142
 gacaccatca ggaactgac 20
 <210> 143
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 143
 gctcctctcc caagatcgg 20
 60
 <210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 144
 5 ggcacccatc agaagcagct 20
 <210> 145
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 145
 agtccggaat gatgatgcc 20
 <210> 146
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 146
 ctgagcagct tgactgtct 20
 30 <210> 147
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 147
 40 cccggtcagc ggatagtagg 20
 <210> 148
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 148
 tgtcacaact taggtggccc 20
 55 <210> 149
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 149
 65 gtctggcaat cccatgttct 20

<210> 150
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 150
 10
 cccacagact tgaagtggag 20
 <210> 151
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 151
 gaactgccca tcaatcttga 20
 25
 <210> 152
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 152
 35
 cccagagagg ccaagctctg 20
 <210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 153
 tgtgttcct gaagcggcca 20
 <210> 154
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 154
 acccagaatc atggcctgat 20
 60
 <210> 155
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 155
 5 ggtgcctgtc tgctcagctg 20
 <210> 156
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 156
 atgtgaaact tgtctctccc 20
 <210> 157
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 157
 tatgtctgca gttgagatag 20
 30 <210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 158
 40 ttgaatccag gatgcagtac 20
 <210> 159
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 159
 gagtctctga gtcacctcac 20
 55 <210> 160
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 160
 65 gatagaatat tgctctgcaa 20

<210> 161
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 161
 10
 cccttgctct accaatgctt 20
 <210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 162
 tccattccct atgtcagcat 20
 25
 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 163
 35
 gactcctca gagccagcgg 20
 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 164
 cccatgctcc gttctcaggt 20
 <210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 165
 cgcaggctcag cctgactaga 20
 60
 <210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 166
 5 cagttagaac actgtggccc 20
 <210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 167
 cagtgtgatg acactgatt 20
 <210> 168
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 168
 ctgtggctaa ctcaatccc 20
 30 <210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 169
 40 cagtactgtt atgactaccc 20
 <210> 170
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 170
 cactgaagac cgtgtgctct 20
 55 <210> 171
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 171
 65 tcgtactgtg ctcccagagg 20

<210> 172
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 172
 10
 aagaggccct ctgctgtaa 20
 <210> 173
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 173
 aagaccacaga atgaatccgg 20
 25
 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 174
 35
 gtctacctca aagcgtgcag 20
 <210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 175
 tagaggctaa cgtaccatct 20
 <210> 176
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 176
 ccatatccat gccacgggtg 20
 60
 <210> 177
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 177
 5 agtttcctca tcagattccc 20
 <210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 178
 cccagtggta ctgttgaca 20
 <210> 179
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 179
 cccagtggcg ccactggctg 20
 30 <210> 180
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 180
 40 gtcaacagtt cctggtacag 20
 <210> 181
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 181
 ccctagtgtat tatcccaggt 20
 55 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 182
 65 ctgaagatta cgtagcacct 20

<210> 183
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 183
 10
 gtccagccaa ctatacttg 20
 <210> 184
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 184
 cctggagcaa gcttcattga 20
 25
 <210> 185
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 185
 35
 tggacagacc aggctgacat 20
 <210> 186
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 186
 atgtgtactt ccgaggtgc 20
 <210> 187
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 187
 tcttcaggat gaagctgcag 20
 60
 <210> 188
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 188
 5 tcagcaaggc ttgccctca 20
 <210> 189
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 189
 ctgcttcct tctggaatgg 20
 <210> 190
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 190
 tgccacattg cccttctcg 20
 30 <210> 191
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 191
 40 gctgatcaga gttgacaagg 20
 <210> 192
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 192
 tactgacagg actggctgct 20
 55 <210> 193
 <231> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 193
 65 gatggcttct gccacatgct 20

<210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 194
 10 gatgtggatt tgggtctctc 20
 <210> 195
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 195
 tgactgcttc atcactgagg 20
 25 <210> 196
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 196
 35 ggtaggtgac cacatctatc 20
 <210> 197
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 197
 tcgcagctgc tgtgctgagg 20
 <210> 198
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 198
 ttccaatgac cgcagaatc 20
 60
 <210> 199
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 199
 5 gatcatcagt gatggcttgg 20
 <210> 200
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 200
 agcctggatg gcagcttct 20
 <210> 201
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 201
 gtctgaagaa gaacctcctg 20
 30 <210> 202
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 202
 40 tatctgcctg tgaaggactc 20
 <210> 203
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 203
 ctgagttcaa gatattggca 20
 55 <210> 204
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 204
 65 cttccaagcc aatctcgatg 20

<210> 205
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 205
 10
 tgcaactgta atccagctcc 20
 <210> 206
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 206
 ccagttcagc ctgcatgttg 20
 25
 <210> 207
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 207
 35
 gtagagacca aatgtaatgt 20
 <210> 208
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 208
 cgttgagta agcgctgag 20
 <210> 209
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 209
 cagctctaat ctggtgtccc 20
 60
 <210> 210
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 210
 5 ctgtcctctc tctggagctc 20
 <210> 211
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 211
 caaggtcata ctctgccgat 20
 <210> 212
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 212
 gtatggaaat aacacccttg 20
 30 <210> 213
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 213
 40 taagctgtag cagatgagtc 20
 <210> 214
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 214
 tagatctctg gaggattgc 20
 55 <210> 215
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 215
 65 gtctagaaca cccaggagag 20

<210> 216
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 216
 10
 accacagagt cagccttcac 20
 <210> 217
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 217
 aagcagacac ctgtggtccc 20
 25
 <210> 218
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 218
 35
 ctctccattg agccggccag 20
 <210> 219
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 219
 cctgatattc agaacgcagc 20
 <210> 220
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 220
 cagtgccata gatgtcagca 20
 60
 <210> 221
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 221
 5 agcaccagga gactacactt 20
 <210> 222
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 222
 cccatccaga ctgaattttg 20
 <210> 223
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 223
 ggttctagcc gtagttccc 20
 30 <210> 224
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 224
 40 aggttaccag ccacatgcag 20
 <210> 225
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 225
 atgtgcatcg atggtcatgg 20
 <210> 226
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 226
 ccagagagcg agttcccat 20
 65 <210> 227

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 227

10 ctagacacga gatgatgact 20
 <210> 228
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

20 <400> 228
 tccaagtcct ggctgtattc 20
 <210> 229
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 229

35 cgtccagtaa gctccacgcc 20
 <210> 230
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 230

45 tcaacggcat ctctcatctc 20
 <210> 231
 50 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

55 <400> 231
 tgatagtgtc catcaagact 20
 60 <210> 232
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 232
 5 gattctgatt tggacttag 20
 <210> 233
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 233
 15 ctctcgatta actcatggac 20
 <210> 234
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 234
 atacactgca actgtggcct 20
 30 <210> 235
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 235
 40 gcaagagtcc accaatcaga 20
 <210> 236
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 236
 agagcctgaa gactgacttc 20
 <210> 237
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 237
 tccctcatct gagaatctgg 20
 65 <210> 238

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 238
 10 cagtgcacatca atgacagatg 20
 <210> 239
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20 <400> 239
 ccgaaccctt gacatctcct 20
 <210> 240
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 240
 gcctcactag caatagttcc 20
 35 <210> 241
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 241
 45 gacatttgcc atggagagag 20
 <210> 242
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 242
 ctgtctccta ccaatgctgg 20
 60 <210> 243
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 243
 5 tctgcactga agtcacggtg 20
 <210> 244
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 244
 15 tcccggaccc tcaactcagt 20
 <210> 245
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 245
 gcaggtccag ttcataatgtg 20
 30 <210> 246
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 246
 40 gccatccttc tgagttcaga 20
 <210> 247
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 247
 gcctcagtct gcttcgcacc 20
 <210> 248
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 248
 ccccgaggt cccggtggga 20
 65 <210> 249

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 249
 10 cagccccgca ggtcccgtg 20
 <210> 250
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20 <400> 250
 caaccgagaa gggcactcag 20
 <210> 251
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 251
 cctcagcggc agcaaccgag 20
 35 <210> 252
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 252
 45 tcctcagcgg cagcaaccga 20
 <210> 253
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 253
 ctctcagcg gcagcaaccg 20
 60 <210> 254
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 254
 5 ggctctcag cggcagcaac 20
 <210> 255
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 255
 15 ggcgggctcc tcagcggcag 20
 <210> 256
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 256
 ggtccatcgc cagctgcggt 20
 30 <210> 257
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 257
 40 ggcgggtcca tcgccagctg 20
 <210> 258
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 258
 tagaggatga tagtaagttc 20
 <210> 259
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 259
 aaatgaagat ttctttaaa 20
 65 <210> 260

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 260

10 tatgtgaaag ttcaattgga 20

 <210> 261
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

20 <400> 261

 atataggcag ttgaatttt 20

 <210> 262
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 262

 gctcactgta tggttttatc 20

35 <210> 263
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 263

45 ggctcactgt atggttttat 20

 <210> 264
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

55 <400> 264

 ggctggctca ctgtatggtt 20

60 <210> 265
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 265
 5 aggctggctc actgtatggt 20
 <210> 266
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 266
 15 aaggctggct cactgtatgg 20
 <210> 267
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 267
 ctactgcaag gctggctcac 20
 30 <210> 268
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 268
 40 actgcctact gcaaggctgg 20
 <210> 269
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 269
 tgcttatagt ctactgccta 20
 <210> 270
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 270
 ttctgcttat agtctactgc 20
 65 <210> 271

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 271
 10 ttggtgcag gtccagttca 20
 <210> 272
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20 <400> 272
 cagctttggt gcaggtccag 20
 <210> 273
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 273
 gccagctttg gtgcaggtcc 20
 35 <210> 274
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 274
 45 tgggtgccagc ttggtgcag 20
 <210> 275
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 275
 gccctggtgc cagctttggt 20
 60 <210> 276
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 276
 5 gagttcagag accttccgag 20
 <210> 277
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 277
 15 aaatgccatc cttctgagtt 20
 <210> 278
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 278
 aaaaatgcca tccttctgag 20
 30 <210> 279
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 279
 40 aaaataactc agatcctgat 20
 <210> 280
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 280
 agcaaaataa ctcagatcct 20
 <210> 281
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 281
 agtttagcaa aataactcag 20
 65 <210> 282

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 282
 10 tcccccaagt ttagcaaat 20
 <210> 283
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20 <400> 283
 ttctctctcc cccaagtta 20
 <210> 284
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 284
 agactccatt tattgttcc 20
 35 <210> 285
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 285
 45 ctctgctg agttacaaac 20
 <210> 286
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 286
 accttctgct tgagtacaa 20
 60 <210> 287
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 287
 5 gcaccttctg ctgagttac 20
 <210> 288
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 288
 15 tcgcaccttc tgcttgagtt 20
 <210> 289
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 289
 cttcgcacct tctgcttgag 20
 30 <210> 290
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 290
 40 tgcttcgcac cttctgctg 20
 <210> 291
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 291
 tctgcttcgc accttctgct 20
 <210> 292
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 292
 agtctgcttc gcaccttctg 20
 65 <210> 293

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 293

10 tcagctgct tcgcacctc 20
 <210> 294
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

20 <400> 294
 cctcagctcg cttgcacct 20
 <210> 295
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 295
 agcctcagtc tgcttcgcac 20

35 <210> 296
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 296

45 gtagcctcag tctgcttcgc 20
 <210> 297
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

55 <400> 297
 tggtagcctc agtctgctc 20

60 <210> 298
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 298
 5 catggtagcc tcagtctgct 20
 <210> 299
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 299
 15 gtcatggtag cctcagtctg 20
 <210> 300
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 300
 atgtcatggt agcctcagtc 20
 30 <210> 301
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 301
 40 gaatgtcatg gtagcctcag 20
 <210> 302
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 302
 ttgaatgtca tggtagcctc 20
 <210> 303
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 303
 atttgaatgt catggtagcc 20
 65 <210> 304

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 304

10 atatttgaat gtcattgtag 20

 <210> 305
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

20 <400> 305

 cagccacatg cagcttcagg 20

 <210> 306
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 306

 accagccaca tgcagcttca 20

35 <210> 307
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 307

45 ttaccagcca catgcagctt 20

 <210> 308
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

55 <400> 308

 ggttaccagc cacatgcagc 20

60 <210> 309
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 309
 5 taggttacca gccacatgca 20
 <210> 310
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 310
 15 tttaggttac cagccacatg 20
 <210> 311
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 311
 ctttaggtt accagccaca 20
 30 <210> 312
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 312
 40 tccttttagg ttaccagcca 20
 <210> 313
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 313
 gctccttta ggttaccagc 20
 <210> 314
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 314
 aggctcctt taggtacca 20
 65 <210> 315

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 315
 10 gtaggctcct ttaggttac 20
 <210> 316
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20 <400> 316
 tggtaggctc ctttaggtt 20
 <210> 317
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 317
 ttggttaggc tcctttagg 20
 35 <210> 318
 <211> 13993
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 40 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (13692)
 45 <400> 318

ES 2 420 914 T3

atg gac ccg ccg agg ccc gcg ctg ctg gcg ctg ctg gcg ctg cct gcg	48
Met Asp Pro Pro Arg Pro Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Pro Ala	
1 5 10 15	
ctg ctg ctg ctg ctg ctg gcg ggc gcc agg gcc gaa gag gaa atg ctg	96
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Arg Ala Glu Glu Glu Met Leu	
20 25 30	
gaa aat gtc agc ctg gtc tgt cca aaa gat gcg acc cga ttc aag cac	144
Glu Asn Val Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Ala Thr Arg Phe Lys His	
35 40 45	
ctc cgg aag tac aca tac aac tat gag gct gag agt tcc agt gga gtc	192
Leu Arg Lys Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu Ala Glu Ser Ser Ser Gly Val	
50 55 60	
cct ggg act gct gat tca aga agt gcc acc agg atc aac tgc aag gtt	240
Pro Gly Thr Ala Asp Ser Arg Ser Ala Thr Arg Ile Asn Cys Lys Val	
65 70 75 80	
gag ctg gag gtt ccc cag ctc tgc agc ttc atc ctg aag acc agc cag	288
Glu Leu Glu Val Pro Gln Leu Cys Ser Phe Ile Leu Lys Thr Ser Gln	
85 90 95	
tgc acc ctg aaa gag gtg tat ggc ttc aac cct gag ggc aaa gcc ttg	336
Cys Thr Leu Lys Glu Val Tyr Gly Phe Asn Pro Glu Gly Lys Ala Leu	
100 105 110	
ctg aag aaa acc aag aac tct gag gag ttt gct gca gcc atg tcc agg	384
Leu Lys Lys Thr Lys Asn Ser Glu Glu Phe Ala Ala Ala Met Ser Arg	
115 120 125	
tat gag ctc aag ctg gcc att cca gaa ggg aag cag gtt ttc ctt tac	432
Tyr Glu Leu Lys Leu Ala Ile Pro Glu Gly Lys Gln Val Phe Leu Tyr	
130 135 140	
ccg gag aaa gat gaa cct act tac atc ctg aac atc aag agg ggc atc	480
Pro Glu Lys Asp Glu Pro Thr Tyr Ile Leu Asn Ile Lys Arg Gly Ile	
145 150 155 160	

ES 2 420 914 T3

att tct gcc ctc ctg gtt ccc cca gag aca gaa gaa gcc aag caa gtg	528
Ile Ser Ala Leu Leu Val Pro Pro Glu Thr Glu Glu Ala Lys Gln Val	
165 170 175	
ttg ttt ctg gat acc gtg tat gga aac tgc tcc act cac ttt acc gtc	576
Leu Phe Leu Arg Thr Val Tyr Gly Asn Cys Ser Thr His Phe Thr Val	
180 185 190	
aag acg agg aag ggc aat gtg gca aca gaa ata tcc act gaa aga gac	624
Lys Thr Arg Lys Gly Asn Val Ala Thr Glu Ile Ser Thr Glu Arg Asp	
195 200 205	
ctg ggg cag tgt gat cgc ttc aag ccc atc cgc aca ggc atc agc cca	672
Leu Gly Gln Cys Asp Arg Phe Lys Pro Ile Arg Thr Gly Ile Ser Pro	
210 215 220	
ctt gct ctc atc aaa ggc atg acc cgc ccc ttg tca act ctg atc agc	720
Leu Ala Leu Ile Lys Gly Met Thr Arg Pro Leu Ser Thr Leu Ile Ser	
225 230 235 240	
agc agc cag tcc tgt cag tac aca ctg gac gct aag agg aag cat gtg	768
Ser Ser Gln Ser Cys Gln Tyr Thr Leu Asp Ala Lys Arg Lys His Val	
245 250 255	
gca gaa gcc atc tgc aag gag caa cac ctc ttc ctg cct ttc tcc tac	816
Ala Glu Ala Ile Cys Lys Glu Gln His Leu Phe Leu Pro Phe Ser Tyr	
260 265 270	
aag aat aag tat ggg atg gta gca caa gtg aca cag act ttg aaa ctt	864
Lys Asn Lys Tyr Gly Met Val Ala Gln Val Thr Gln Thr Leu Lys Leu	
275 280 285	
gaa gac aca cca aag atc aac agc cgc ttc ttt ggt gaa ggt act aag	912
Glu Asp Thr Pro Lys Ile Asn Ser Arg Phe Phe Gly Glu Gly Thr Lys	
290 295 300	
aag atg ggc ctc gca ttt gag agc acc aaa tcc aca tca cct cca aag	960
Lys Met Gly Leu Ala Phe Glu Ser Thr Lys Ser Thr Ser Pro Pro Lys	
305 310 315 320	
cag gcc gaa gct gtt ttg aag act ctc cag gaa ctg aaa aaa cta acc	1008
Gln Ala Glu Ala Val Leu Lys Thr Leu Gln Glu Leu Lys Lys Leu Thr	
325 330 335	
atc tct gag caa aat atc cag aga gct aat ctc ttc aat aag ctg gtt	1056
Ile Ser Glu Gln Asn Ile Gln Arg Ala Asn Leu Phe Asn Lys Leu Val	
340 345 350	
act gag ctg aga ggc ctc agt gat gaa gca gtc aca tct ctc ttg cca	1104
Thr Glu Leu Arg Gly Leu Ser Asp Glu Ala Val Thr Ser Leu Leu Pro	
355 360 365	
cag ctg att gag gtg tcc agc ccc atc act tta caa gcc ttg gtt cag	1152
Gln Leu Ile Glu Val Ser Ser Pro Ile Thr Leu Gln Ala Leu Val Gln	
370 375 380	
tgt gga cag cct cag tgc tcc act cac atc ctc cag tgg ctg aaa cgt	1200
Cys Gly Gln Pro Gln Cys Ser Thr His Ile Leu Gln Trp Leu Lys Arg	
385 390 395 400	

ES 2 420 914 T3

gtg cat gcc aac ccc ett ctg ata gat gtg gtc acc tac ctg gtg gcc	1248
Val His Ala Asn Pro Leu Ile Asp Val Val Thr Tyr Leu Val Ala	
405 410 415	
ctg atc ccc gag ccc tca gca cag cag ctg cga gag atc ttc aac atg	1296
Leu Ile Pro Glu Pro Ser Ala Gln Leu Arg Glu Ile Phe Asn Met	
420 425 430	
gcg agg gat cag cgc agc cga gcc acc ttg tat gcg ctg agc cac gcg	1344
Ala Arg Asp Gln Arg Ser Arg Ala Thr Leu Tyr Ala Leu Ser His Ala	
435 440 445	
gtc aac aac tat cat aag aca aac cct aca ggg acc cag gag ctg ctg	1392
Val Asn Asn Tyr His Lys Thr Asn Pro Thr Gly Thr Gln Glu Leu Leu	
450 455 460	
gac att gct aat tac ctg atg gaa cag att caa gat gac tgc act ggg	1440
Asp Ile Ala Asn Tyr Leu Met Glu Gln Ile Gln Asp Asp Cys Thr Gly	
465 470 475 480	
gat gaa gat tac acc tat ttg att ctg cgg gtc att gga aat atg ggc	1488
Asp Glu Asp Tyr Thr Tyr Leu Ile Leu Arg Val Ile Gly Asn Met Gly	
485 490 495	
caa acc atg gag cag tta act cca gaa ctc aag tct tca atc ctg aaa	1536
Gln Thr Met Glu Gln Leu Thr Pro Glu Leu Lys Ser Ser Ile Leu Lys	
500 505 510	
tgt gtc caa agt aca aag cca tca ctg atg atc cag aaa gct gcc atc	1584
Cys Val Gln Ser Thr Lys Pro Ser Leu Met Ile Gln Lys Ala Ala Ile	
515 520 525	
cag gct ctg cgg aaa atg gag cct aaa gac aag gac cag gag gtt ctt	1632
Gln Ala Leu Arg Lys Met Glu Pro Lys Asp Lys Asp Gln Glu Val Leu	
530 535 540	
ctt cag act ttc ctt gat gat gct tct ccg gga gat aag cga ctg gct	1680
Leu Gln Thr Phe Leu Asp Asp Ala Ser Pro Gly Asp Lys Arg Leu Ala	
545 550 555 560	
gcc tat ctt atg ttg atg agg agt cct tca cag gca gat att aac aaa	1728
Ala Tyr Leu Met Leu Met Arg Ser Pro Ser Gln Ala Asp Ile Asn Lys	
565 570 575	
att gtc caa att cta cca tgg gaa cag aat gag caa gtg aag aac ttt	1776
Ile Val Gln Ile Leu Pro Trp Glu Gln Asn Glu Gln Val Lys Asn Phe	
580 585 590	
gtg gct tcc cat att gcc aat atc ttg aac tca gaa gaa ttg gat atc	1824
Val Ala Ser His Ile Ala Asn Ile Leu Asn Ser Glu Glu Leu Asp Ile	
595 600 605	
caa gat ctg aaa aag tta gtg aaa gaa gct ctg aaa gaa tct caa ctt	1872
Gln Asp Leu Lys Lys Leu Val Lys Glu Ala Leu Lys Glu Ser Gln Leu	
610 615 620	
cca act gtc atg gac ttc aga aaa ttc tct cgg aac tat caa ctc tac	1920
Pro Thr Val Met Asp Phe Arg Lys Phe Ser Arg Asn Tyr Gln Leu Tyr	
625 630 635 640	
aaa tct gtt tct ctt cca tca ctt gac cca gcc tca gcc aaa ata gaa	1968
Lys Ser Val Ser Leu Pro Ser Leu Asp Pro Ala Ser Ala Lys Ile Glu	
645 650 655	

ES 2 420 914 T3

ggg aat ctt ata ttt gat cca aat aac tac ctt cct aaa gaa agc atg Gly Asn Leu Ile Phe Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Pro Lys Glu Ser Met	2016
660 665 670	
ctg aaa act acc ctc act gcc ttt gga ttt gct tca gct gac ctc atc Leu Lys Thr Thr Leu Thr Ala Phe Gly Phe Ala Ser Ala Asp Leu Ile	2064
675 680 685	
gag att ggc ttg gaa gga aaa ggc ttt gag cca aca ttg gag gct cct Glu Ile Gly Leu Glu Gly Lys Gly Phe Glu Pro Thr Leu Glu Ala Pro	2112
690 695 700	
ttt ggg aag caa gga ttt ttc cca gac agt gtc aac aaa gct ttg tac Phe Gly Lys Gln Gly Phe Phe Pro Asp Ser Val Asn Lys Ala Leu Tyr	2160
705 710 715 720	
tgg gtt aat ggt caa gtt cct gat ggt gtc tct aag gtc tta gtg gac Trp Val Asn Gly Gln Val Pro Asp Gly Val Ser Lys Val Leu Val Asp	2208
725 730 735	
cac ttt ggc tat acc aaa gat gat aaa cat gag cag gat atg gta aat His Phe Gly Tyr Thr Lys Asp Asp Lys His Glu Gln Asp Met Val Asn	2256
740 745 750	
gga ata atg ctc agt gtt gag aag ctg att aaa gat ttg aaa tcc aaa Gly Ile Met Leu Ser Val Glu Lys Leu Ile Lys Asp Leu Lys Ser Lys	2304
755 760 765	
gaa gtc ccg gaa gcc aga gcc tac ctc cgc atc ttg gga gag gag ctt Glu Val Pro Glu Ala Arg Ala Tyr Leu Arg Ile Leu Gly Glu Glu Leu	2352
770 775 780	
ggt ttt gcc agt ctc cat gac ctc cga ctc ctg gga aag ctg ctt ctg Gly Phe Ala Ser Leu His Asp Leu Arg Leu Leu Gly Lys Leu Leu Leu	2400
785 790 795 800	
atg ggt gcc cgc act ctg cag ggg atc ccc cag atg att gga gag gtc Met Gly Ala Arg Thr Leu Gln Gly Ile Pro Gln Met Ile Gly Glu Val	2448
805 810 815	
atc agg aag ggc tca aag aat gac ttt ttt ctt cac tac atc ttc atg Ile Arg Lys Gly Ser Lys Asn Asp Phe Phe Leu His Tyr Ile Phe Met	2496
820 825 830	
gag aat gcc ttt gaa ctc ccc act gga gct gga tta cag ttg caa ata Glu Asn Ala Phe Glu Leu Pro Thr Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln Ile	2544
835 840 845	
tct tca tct gga gtc att gct ccc gga gcc aag gct gga gta aaa ctg Ser Ser Ser Gly Val Ile Ala Pro Gly Ala Lys Ala Gly Val Lys Leu	2592
850 855 860	
gaa gta gcc aac atg cag gct gaa ctg gtg gca aaa ccc tcc gtg tct Glu Val Ala Asn Met Gln Ala Glu Leu Val Ala Lys Pro Ser Val Ser	2640
865 870 875 880	
gtg gag ttt gtg aca aat atg ggc atc atc att ccg gac ttc gct agg Val Glu Phe Val Thr Asn Met Gly Ile Ile Ile Pro Asp Phe Ala Arg	2688
885 890 895	

ES 2 420 914 T3

agt ggg gtc cag atg aac acc aac ttc ttc cac gag tcg ggt ctg gag	2736
Ser Gly Val Gln Met Asn Thr Asn Phe Phe His Glu Ser Gly Leu Glu	
900 905 910	
gct cat gtt gcc cta aaa gct ggg aag ctg aag ttt atc att cct tcc	2784
Ala His Val Ala Leu Lys Ala Gly Lys Leu Lys Phe Ile Ile Pro Ser	
915 920 925	
cca aag aga cca gtc aag ctg ctc agt gga ggc aac aca tta cat ttg	2832
Pro Lys Arg Pro Val Lys Leu Leu Ser Gly Gly Asn Thr Leu His Leu	
930 935 940	
gtc tct acc acc aaa acg gag gtc atc cca cct ctc att gag aac agg	2880
Val Ser Thr Thr Lys Thr Glu Val Ile Pro Pro Leu Ile Glu Asn Arg	
945 950 955 960	
cag tcc tgg tca gtt tgc aag caa gtc ttt cct ggc ctg aat tac tgc	2928
Gln Ser Trp Ser Val Cys Lys Gln Val Phe Pro Gly Leu Asn Tyr Cys	
965 970 975	
acc tca ggc gct tac tcc aac gcc agc tcc aca gac tcc gcc tcc tac	2976
Thr Ser Gly Ala Tyr Ser Asn Ala Ser Ser Thr Asp Ser Ala Ser Tyr	
980 985 990	
tat ccg ctg acc ggg gac acc aga tta gag ctg gaa ctg agg cct aca	3024
Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Arg Leu Glu Leu Glu Leu Arg Pro Thr	
995 1000 1005	
gga gag att gag cag tat tct gtc agc gca acc tat gag ctc cag aga	3072
Gly Glu Ile Glu Gln Tyr Ser Val Ser Ala Thr Tyr Glu Leu Gln Arg	
1010 1015 1020	
gag gac aga gcc ttg gtg gat acc ctg aag ttt gta act caa gca gaa	3120
Glu Asp Arg Ala Leu Val Asp Thr Leu Lys Phe Val Thr Gln Ala Glu	
1025 1030 1035 1040	
ggc gcg aag cag act gag gct acc atg aca ttc aaa tat aat cgg cag	3168
Gly Ala Lys Gln Thr Glu Ala Thr Met Thr Phe Lys Tyr Asn Arg Gln	
1045 1050 1055	
agt atg acc ttg tcc agt gaa gtc caa att ccg gat ttt gat gtt gac	3216
Ser Met Thr Leu Ser Ser Glu Val Gln Ile Pro Asp Phe Asp Val Asp	
1060 1065 1070	
ctc gga aca atc ctc aga gtt aat gat gaa tct act gag ggc aaa acg	3264
Leu Gly Thr Ile Leu Arg Val Asn Asp Glu Ser Thr Glu Gly Lys Thr	
1075 1080 1085	
tct tac aga ctc acc ctg gac att cag aac aag aaa att act gag gtc	3312
Ser Tyr Arg Leu Thr Leu Asp Ile Gln Asn Lys Lys Ile Thr Glu Val	
1090 1095 1100	
gcc ctc atg ggc cac cta agt tgt gac aca aag gaa gaa aga aaa atc	3360
Ala Leu Met Gly His Leu Ser Cys Asp Thr Lys Glu Glu Arg Lys Ile	
1105 1110 1115 1120	
aag ggt gtt att tcc ata ccc cgt ttg caa gca gaa gcc aga agt gag	3408
Lys Gly Val Ile Ser Ile Pro Arg Leu Gln Ala Glu Ala Arg Ser Glu	
1125 1130 1135	
atc ctc gcc cac tgg tcg cct gcc aaa ctg ctt ctc caa atg gac tca	3456
Ile Leu Ala His Trp Ser Pro Ala Lys Leu Leu Leu Gln Met Asp Ser	
1140 1145 1150	

ES 2 420 914 T3

tct gct aca gct tat ggc tcc aca gtt tcc aag agg gtg gca tgg cat	3504
Ser Ala Thr Ala Tyr Gly Ser Thr Val Ser Lys Arg Val Ala Trp His	
1155 1160 1165	
tat gat gaa gag aag att gaa ttt gaa tgg aac aca ggc acc aat gta	3552
Tyr Asp Glu Glu Lys Ile Glu Phe Glu Trp Asn Thr Gly Thr Asn Val	
1170 1175 1180	
gat acc aaa aaa atg act tcc aat ttc cct gtg gat ctc tcc gat tat	3600
Asp Thr Lys Lys Met Thr Ser Asn Phe Pro Val Asp Leu Ser Asp Tyr	
1185 1190 1195 1200	
cct aag agc ttg cat atg tat gct aat aga ctc ctg gat cac aga gtc	3648
Pro Lys Ser Leu His Met Tyr Ala Asn Arg Leu Leu Asp His Arg Val	
1205 1210 1215	
cct caa aca gac atg act ttc cgg cac gtg ggt tcc aaa tta ata gtt	3696
Pro Gln Thr Asp Met Thr Phe Arg His Val Gly Ser Lys Leu Ile Val	
1220 1225 1230	
gca atg agc tca tgg ctt cag aag gca tct ggg agt ctt cct tat acc	3744
Ala Met Ser Ser Trp Leu Gln Lys Ala Ser Gly Ser Leu Pro Tyr Thr	
1235 1240 1245	
cag act ttg caa gac cac ctc aat agc ctg aag gag ttc aac ctc cag	3792
Gln Thr Leu Gln Asp His Leu Asn Ser Leu Lys Glu Phe Asn Leu Gln	
1250 1255 1260	
aac atg gga ttg cca gac tcc cac atc cca gaa aac ctc ttc tta aaa	3840
Asn Met Gly Leu Pro Asp Ser His Ile Pro Glu Asn Leu Phe Leu Lys	
1265 1270 1275 1280	
agc gat ggc cgc gtc aaa tat acc ttg aac aag aac agt ttg aaa att	3888
Ser Asp Gly Arg Val Lys Tyr Thr Leu Asn Lys Asn Ser Leu Lys Ile	
1285 1290 1295	
gag att cct ttg cct ttt ggt ggc aaa tcc tcc aga gat cta aag atg	3936
Glu Ile Pro Leu Pro Phe Gly Gly Lys Ser Ser Arg Asp Leu Lys Met	
1300 1305 1310	
tta gag act gtt agg aca cca gcc ctc cac ttc aag tct gtg gga ttc	3984
Leu Glu Thr Val Arg Thr Pro Ala Leu His Phe Lys Ser Val Gly Phe	
1315 1320 1325	
cat ctg cca tct cga gag ttc caa gtc cct act ttt acc att ccc aag	4032
His Leu Pro Ser Arg Glu Phe Gln Val Pro Thr Phe Thr Ile Pro Lys	
1330 1335 1340	
ttg tat caa ctg caa gtg cct ctc ctg ggt gtt cta gac ctc tcc acg	4080
Leu Tyr Gln Leu Gln Val Pro Leu Leu Gly Val Leu Asp Leu Ser Thr	
1345 1350 1355 1360	
aat gtc tac agc aac ttg tac aac tgg tcc gcc tcc tac agt ggt ggc	4128
Asn Val Tyr Ser Asn Leu Tyr Asn Trp Ser Ala Ser Tyr Ser Gly Gly	
1365 1370 1375	
aac acc agc aca gac cat ttc agc ctt cgg gct cgt tac cac atg aag	4176
Asn Thr Ser Thr Asp His Phe Ser Leu Arg Ala Arg Tyr His Met Lys	
1380 1385 1390	

ES 2 420 914 T3

gct gac tct gtg gtt gac ctg ctt tcc tac aat gtg caa gga tct gga Ala Asp Ser Val Val Asp Leu Leu Ser Tyr Asn Val Gln Gly Ser Gly 1395 1400 1405	4224
gaa aca aca tat gac cac aag aat acg ttc aca cta tca tgt gat ggg Glu Thr Thr Tyr Asp His Lys Asn Thr Phe Thr Leu Ser Cys Asp Gly 1410 1415 1420	4272
tct cta cgc cac aaa ttt cta gat tcg aat atc aaa ttc agt cat gta Ser Leu Arg His Lys Phe Leu Asp Ser Asn Ile Lys Phe Ser His Val 1425 1430 1435 1440	4320
gaa aaa ctt gga aac aac cca gtc tca aaa ggt tta cta ata ttc gat Glu Lys Leu Gly Asn Asn Pro Val Ser Lys Gly Leu Leu Ile Phe Asp 1445 1450 1455	4368
gca tct agt tcc tgg gga cca cag atg tct gct tca gtt cat ttg gac Ala Ser Ser Ser Trp Gly Pro Gln Met Ser Ala Ser Val His Leu Asp 1460 1465 1470	4416
tcc aaa aag aaa cag cat ttg ttt gtc aaa gaa gtc aag att gat ggg Ser Lys Lys Lys Gln His Leu Phe Val Lys Glu Val Lys Ile Asp Gly 1475 1480 1485	4464
cag ttc aga gtc tct tcg ttc tat gct aaa ggc aca tat ggc ctg tct Gln Phe Arg Val Ser Ser Phe Tyr Ala Lys Gly Thr Tyr Gly Leu Ser 1490 1495 1500	4512
tgt cag agg gat cct aac act ggc cgg ctc aat gga gag tcc aac ctg Cys Gln Arg Asp Pro Asn Thr Gly Arg Leu Asn Gly Glu Ser Asn Leu 1505 1510 1515 1520	4560
agg ttt aac tcc tcc tac ctc caa ggc acc aac cag ata aca gga aga Arg Phe Asn Ser Ser Tyr Leu Gln Gly Thr Asn Gln Ile Thr Gly Arg 1525 1530 1535	4608
tat gaa gat gga acc ctc tcc ctc acc tcc acc tct gat ctg caa agt Tyr Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Thr Ser Thr Ser Asp Leu Gln Ser 1540 1545 1550	4656
ggc atc att aaa aat act gct tcc cta aag tat gag aac tac gag ctg Gly Ile Ile Lys Asn Thr Ala Ser Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Glu Leu 1555 1560 1565	4704
act tta aaa tct gac acc aat ggg aag tat aag aac ttt gcc act tct Thr Leu Lys Ser Asp Thr Asn Gly Lys Tyr Lys Asn Phe Ala Thr Ser 1570 1575 1580	4752
aac aag atg gat atg acc ttc tct aag caa aat gca ctg ctg cgt tct Asn Lys Met Asp Met Thr Phe Ser Lys Gln Asn Ala Leu Leu Arg Ser 1585 1590 1595 1600	4800
gaa tat cag gct gat tac gag tca ttg agg ttc ttc agc ctg ctt tct Glu Tyr Gln Ala Asp Tyr Glu Ser Leu Arg Phe Phe Ser Leu Leu Ser 1605 1610 1615	4848
gga tca cta aat tcc cat ggt ctt gag tta aat gct gac atc tta ggc Gly Ser Leu Asn Ser His Gly Leu Glu Leu Asn Ala Asp Ile Leu Gly 1620 1625 1630	4896
act gac aaa att aat agt ggt gct cac aag gcg aca cta agg att ggc	4944

ES 2 420 914 T3

Thr	Asp	Lys	Ile	Asn	Ser	Gly	Ala	His	Lys	Ala	Thr	Leu	Arg	Ile	Gly		
		1635					1640					1645					
caa	gat	gga	ata	tct	acc	agt	gca	acg	acc	aac	ttg	aag	tgt	agt	ctc	4992	
Gln	Asp	Gly	Ile	Ser	Thr	Ser	Ala	Thr	Thr	Asn	Leu	Lys	Cys	Ser	Leu		
		1650					1655				1660						
ctg	gtg	ctg	gag	aat	gag	ctg	aat	gca	gag	ctt	ggc	ctc	tct	ggg	gca	5040	
Leu	Val	Leu	Glu	Asn	Glu	Leu	Asn	Ala	Glu	Leu	Gly	Leu	Ser	Gly	Ala		
		1665					1670				1675				1680		
tct	atg	aaa	tta	aca	aca	aat	ggc	cgc	ttc	agg	gaa	cac	aat	gca	aaa	5088	
Ser	Met	Lys	Leu	Thr	Thr	Asn	Gly	Arg	Phe	Arg	Glu	His	Asn	Ala	Lys		
				1685					1690					1695			
ttc	agt	ctg	gat	ggg	aaa	gcc	gcc	ctc	aca	gag	cta	tca	ctg	gga	agt	5136	
Phe	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Glu	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser		
			1700					1705					1710				
gct	tat	cag	gcc	atg	att	ctg	ggt	gtc	gac	agc	aaa	aac	att	ttc	aac	5184	
Ala	Tyr	Gln	Ala	Met	Ile	Leu	Gly	Val	Asp	Ser	Lys	Asn	Ile	Phe	Asn		
		1715					1720					1725					
ttc	aag	gtc	agt	caa	gaa	gga	ctt	aag	ctc	tca	aat	gac	atg	atg	ggc	5232	
Phe	Lys	Val	Ser	Gln	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Ser	Asn	Asp	Met	Met	Gly		
		1730					1735					1740					
tca	tat	gct	gaa	atg	aaa	ttt	gac	cac	aca	aac	agt	ctg	aac	att	gca	5280	
Ser	Tyr	Ala	Glu	Met	Lys	Phe	Asp	His	Thr	Asn	Ser	Leu	Asn	Ile	Ala		
		1745				1750				1755				1760			
ggc	tta	tca	ctg	gac	ttc	tct	tca	aaa	ctt	gac	aac	att	tac	agc	tct	5328	
Gly	Leu	Ser	Leu	Asp	Phe	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Asn	Ile	Tyr	Ser	Ser		
				1765					1770				1775				
gac	aag	ttt	tat	aag	caa	act	gtt	aat	tta	cag	cta	cag	ccc	tat	tct	5376	
Asp	Lys	Phe	Tyr	Lys	Gln	Thr	Val	Asn	Leu	Gln	Leu	Gln	Pro	Tyr	Ser		
			1780					1785					1790				
ctg	gta	act	act	tta	aac	agt	gac	ctg	aaa	tac	aat	gct	ctg	gat	ctc	5424	
Leu	Val	Thr	Thr	Leu	Asn	Ser	Asp	Leu	Lys	Tyr	Asn	Ala	Leu	Asp	Leu		
			1795					1800				1805					
acc	aac	aat	ggg	aaa	cta	cgg	cta	gaa	ccc	ctg	aag	ctg	cat	gtg	gct	5472	
Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Leu	Arg	Leu	Glu	Pro	Leu	Lys	Leu	His	Val	Ala		
		1810				1815					1820						
ggt	aac	cta	aaa	gga	gcc	tac	caa	aat	aat	gaa	ata	aaa	cac	atc	tat	5520	
Gly	Asn	Leu	Lys	Gly	Ala	Tyr	Gln	Asn	Asn	Glu	Ile	Lys	His	Ile	Tyr		
		1825				1830				1835					1840		
gcc	atc	tct	tct	gct	gcc	tta	tca	gca	agc	tat	aaa	gca	gac	act	gtt	5568	
Ala	Ile	Ser	Ser	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Tyr	Lys	Ala	Asp	Thr	Val		
				1845					1850					1855			
gct	aag	gtt	cag	ggt	gtg	gag	ttt	agc	cat	ggg	ctc	aac	aca	gac	atc	5616	
Ala	Lys	Val	Gln	Gly	Val	Glu	Phe	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Thr	Asp	Ile		
			1860					1865					1870				
gct	ggg	ctg	gct	tca	gcc	att	gac	atg	agc	aca	aac	tat	aat	tca	gac	5664	
Ala	Gly	Leu	Ala	Ser	Ala	Ile	Asp	Met	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Asp		
		1875					1880					1885					

ES 2 420 914 T3

tca ctg cat ttc agc aat gtc ttc cgt tct gta atg gcc ccg ttt acc	5712
Ser Leu His Phe Ser Asn Val Phe Arg Ser Val Met Ala Pro Phe Thr	
1890 1895 1900	
atg acc atc gat gca cat aca aat ggc aat ggg aaa ctc gct ctc tgg	5760
Met Thr Ile Asp Ala His Thr Asn Gly Asn Gly Lys Leu Ala Leu Trp	
1905 1910 1915 1920	
gga gaa cat act ggg cag ctg tat agc aaa ttc ctg ttg aaa gca gaa	5808
Gly Glu His Thr Gly Gln Leu Tyr Ser Lys Phe Leu Leu Lys Ala Glu	
1925 1930 1935	
cct ctg gca ttt act ttc tct cat gat tac aaa ggc tcc aca agt cat	5856
Pro Leu Ala Phe Thr Phe Ser His Asp Tyr Lys Gly Ser Thr Ser His	
1940 1945 1950	
cat ctc gtg tct agg aaa agc atc agt gca gct ctt gaa cac aaa gtc	5904
His Leu Val Ser Arg Lys Ser Ile Ser Ala Ala Leu Glu His Lys Val	
1955 1960 1965	
agt gcc ctg ctt act cca gct gag cag aca ggc acc tgg aaa ctc aag	5952
Ser Ala Leu Leu Thr Pro Ala Glu Gln Thr Gly Thr Trp Lys Leu Lys	
1970 1975 1980	
acc caa ttt aac aac aat gaa tac agc cag gac ttg gat gct tac aac	6000
Thr Gln Phe Asn Asn Asn Glu Tyr Ser Gln Asp Leu Asp Ala Tyr Asn	
1985 1990 1995 2000	
act aaa gat aaa att ggc gtg gag ctt act gga cga act ctg gct gac	6048
Thr Lys Asp Lys Ile Gly Val Glu Leu Thr Gly Arg Thr Leu Ala Asp	
2005 2010 2015	
cta act cta cta gac tcc cca att aaa gtg cca ctt tta ctc agt gag	6096
Leu Thr Leu Leu Asp Ser Pro Ile Lys Val Pro Leu Leu Leu Ser Glu	
2020 2025 2030	
ccc atc aat atc aat gat gct tta gag atg aga gat gcc gtt gag aag	6144
Pro Ile Asn Ile Asn Asp Ala Leu Glu Met Arg Asp Ala Val Glu Lys	
2035 2040 2045	
ccc caa gaa ttt aca att gtt gct ttt gta aag tat gat aaa aac caa	6192
Pro Gln Glu Phe Thr Ile Val Ala Phe Val Lys Tyr Asp Lys Asn Gln	
2050 2055 2060	
gat gtt cac tcc att aac ctc cca ttt ttt gag acc ttg caa gaa tat	6240
Asp Val His Ser Ile Asn Leu Pro Phe Phe Glu Thr Leu Gln Glu Tyr	
2065 2070 2075 2080	
ttt gag agg aat cga caa acc att ata gtt gta ctg gaa aac gta cag	6288
Phe Glu Arg Asn Arg Gln Thr Ile Ile Val Val Leu Glu Asn Val Gln	
2085 2090 2095	
aga aac ctg aag cac atc aat att gat caa ttt gta aga aaa tac aga	6336
Arg Asn Leu Lys His Ile Asn Ile Asp Gln Phe Val Arg Lys Tyr Arg	
2100 2105 2110	
gca gcc ctg gga aaa ctc cca cag caa gct aat gat tat ctg aat tca	6384
Ala Ala Leu Gly Lys Leu Pro Gln Gln Ala Asn Asp Tyr Leu Asn Ser	
2115 2120 2125	
ttc aat tgg gag aga caa gtt tca cat gcc aag gag aaa ctg act gct	6432

ES 2 420 914 T3

Phe Asn Trp Glu Arg Gln Val Ser His Ala Lys Glu Lys Leu Thr Ala	
2130 2135 2140	
ctc aca aaa aag tat aga att aca gaa aat gat ata caa att gca tta	6480
Leu Thr Lys Lys Tyr Arg Ile Thr Glu Asn Asp Ile Gln Ile Ala Leu	
2145 2150 2155 2160	
gat gat gcc aaa atc aac ttt aat gaa aaa cta tct caa ctg cag aca	6528
Asp Asp Ala Lys Ile Asn Phe Asn Glu Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr	
2165 2170 2175	
tat atg ata caa ttt gat cag tat att aaa gat agt tat gat tta cat	6576
Tyr Met Ile Gln Phe Asp Gln Tyr Ile Lys Asp Ser Tyr Asp Leu His	
2180 2185 2190	
gat ttg aaa ata gct att gct aat att att gat gaa atc att gaa aaa	6624
Asp Leu Lys Lys Ile Ala Ile Ala Asn Ile Ile Asp Glu Ile Ile Glu Lys	
2195 2200 2205	
tta aaa agt ctt gat gag cac tat cat acc cgt gta aat tta gta aaa	6672
Leu Lys Ser Leu Asp Glu His Tyr His Thr Arg Val Asn Leu Val Lys	
2210 2215 2220	
aca atc cat gat cta cat ttg ttt att gaa aat att gat ttt aac aaa	6720
Thr Ile His Asp Leu His Leu Phe Ile Glu Asn Ile Asp Phe Asn Lys	
2225 2230 2235 2240	
agt gga agt agt act gca tcc tgg att caa aat gtg gat act aag tac	6768
Ser Gly Ser Ser Thr Ala Ser Trp Ile Gln Asn Val Asp Thr Lys Tyr	
2245 2250 2255	
caa atc aga atc cag ata caa gaa aaa ctg cag cag ctt aag aga cac	6816
Gln Ile Arg Ile Gln Ile Gln Glu Lys Leu Gln Gln Leu Lys Arg His	
2260 2265 2270	
ata cag aat ata gac atc cag cac cta gct gga aag tta aaa caa cac	6864
Ile Gln Asn Ile Asp Ile Gln His Leu Ala Gly Lys Leu Lys Gln His	
2275 2280 2285	
att gag gct att gat gtt aga gtg ctt tta gat caa ttg gga act aca	6912
Ile Glu Ala Ile Asp Val Arg Val Leu Leu Asp Gln Leu Gly Thr Thr	
2290 2295 2300	
att tca ttt gaa aga ata aat gat gtt ctt gag cat gtc aaa cac ttt	6960
Ile Ser Phe Glu Arg Ile Asn Asp Val Leu Glu His Val Lys His Phe	
2305 2310 2315 2320	
gtt ata aat ctt att ggg gat ttt gaa gta gct gag aaa atc aat gcc	7008
Val Ile Asn Leu Ile Gly Asp Phe Glu Val Ala Glu Lys Ile Asn Ala	
2325 2330 2335	
ttc aga gcc aaa gtc cat gag tta atc gag agg tat gaa gta gac caa	7056
Phe Arg Ala Lys Val His Glu Leu Ile Glu Arg Tyr Glu Val Asp Gln	
2340 2345 2350	
caa atc cag gtt tta atg gat aaa tta gta gag ttg gcc cac caa tac	7104
Gln Ile Gln Val Leu Met Asp Lys Leu Val Glu Leu Ala His Gln Tyr	
2355 2360 2365	
aag ttg aag gag act att cag aag cta agc aat gtc cta caa caa gtt	7152
Lys Leu Lys Glu Thr Ile Gln Lys Leu Ser Asn Val Leu Gln Gln Val	
2370 2375 2380	

ES 2 420 914 T3

aag ata aaa gat tac ttt gag aaa ttg gtt gga ttt att gat gat gct Lys Ile Lys Asp Tyr Phe Glu Lys Leu Val Gly Phe Ile Asp Asp Ala 2385 2390 2395 2400	7200
gtc aag aag ctt aat gaa tta tct ttt aaa aca ttc att gaa gat gtt Val Lys Lys Leu Asn Glu Leu Ser Phe Lys Thr Phe Ile Glu Asp Val 2405 2410 2415	7248
aac aaa ttc ctt gac atg ttg ata aag aaa tta aag tca ttt gat tac Asn Lys Phe Leu Asp Met Leu Ile Lys Lys Leu Lys Ser Phe Asp Tyr 2420 2425 2430	7296
cac cag ttt gta gat gaa acc aat gac aaa atc cgt gag gtg act cag His Gln Phe Val Asp Glu Thr Asn Asp Lys Ile Arg Glu Val Thr Gln 2435 2440 2445	7344
aga ctc aat ggt gaa att cag gct ctg gaa cta cca caa aaa gct gaa Arg Leu Asn Gly Glu Ile Gln Ala Leu Glu Leu Pro Gln Lys Ala Glu 2450 2455 2460	7392
gca tta aaa ctg ttt tta gag gaa acc aag gcc aca gtt gca gtg tat Ala Leu Lys Leu Phe Leu Glu Glu Thr Lys Ala Thr Val Ala Val Tyr 2465 2470 2475 2480	7440
ctg gaa agc cta cag gac acc aaa ata acc tta atc atc aat tgg tta Leu Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Ile Thr Leu Ile Ile Asn Trp Leu 2485 2490 2495	7488
cag gag gct tta agt tca gca tct ttg gct cac atg aag gcc aaa ttc Gln Glu Ala Leu Ser Ser Ala Ser Leu Ala His Met Lys Ala Lys Phe 2500 2505 2510	7536
cga gag act cta gaa gat aca cga gac cga atg tat caa atg gac att Arg Glu Thr Leu Glu Asp Thr Arg Asp Arg Met Tyr Gln Met Asp Ile 2515 2520 2525	7584
cag cag gaa ctt caa cga tac ctg tct ctg gta ggc cag gtt tat agc Gln Gln Glu Leu Gln Arg Tyr Leu Ser Leu Val Gly Gln Val Tyr Ser 2530 2535 2540	7632
aca ctt gtc acc tac att tct gat tgg tgg act ctt gct gct aag aac Thr Leu Val Thr Tyr Ile Ser Asp Trp Thr Thr Leu Ala Ala Lys Asn 2545 2550 2555 2560	7680
ctt act gac ttt gca gag caa tat tct atc caa gat tgg gct aaa cgt Leu Thr Asp Phe Ala Glu Gln Tyr Ser Ile Gln Asp Trp Ala Lys Arg 2565 2570 2575	7728
atg aaa gca ttg gta gag caa ggg ttc act gtt cct gaa atc aag acc Met Lys Ala Leu Val Glu Gln Gly Phe Thr Val Pro Glu Ile Lys Thr 2580 2585 2590	7776
atc ctt ggg acc atg cct gcc ttt gaa gtc agt ctt cag gct ctt cag Ile Leu Gly Thr Met Pro Ala Phe Glu Val Ser Leu Gln Ala Leu Gln 2595 2600 2605	7824
aaa gct acc ttc cag aca cct gat ttt ata gtc ccc cta aca gat ttg Lys Ala Thr Phe Gln Thr Pro Asp Phe Ile Val Pro Leu Thr Asp Leu 2610 2615 2620	7872
agg att cca tca gtt cag ata aac ttc aaa gac tta aaa aat ata aaa	7920

ES 2 420 914 T3

Arg Ile Pro Ser Val Gln Ile Asn Phe Lys Asp Leu Lys Asn Ile Lys	
2625 2630 2635 2640	
atc cca tcc agg ttt tcc aca cca gaa ttt acc atc ctt aac acc ttc	7968
Ile Pro Ser Arg Phe Ser Thr Pro Glu Phe Thr Ile Leu Asn Thr Phe	
2645 2650 2655	
cac att cct tcc ttt aca att gac ttt gta gaa atg aaa gta aag atc	8016
His Ile Pro Ser Phe Thr Ile Asp Phe Val Glu Met Lys Val Lys Ile	
2660 2665 2670	
atc aga acc att gac cag atg ctg aac agt gag ctg cag tgg ccc gtt	8064
Ile Arg Thr Ile Asp Gln Met Leu Asn Ser Glu Leu Gln Trp Pro Val	
2675 2680 2685	
cca gat ata tat ctc agg gat ctg aag gtg gag gac att cct cta gcg	8112
Pro Asp Ile Tyr Leu Arg Asp Leu Lys Val Glu Asp Ile Pro Leu Ala	
2690 2695 2700	
aga atc acc ctg cca gac ttc cgt tta cca gaa atc gca att cca gaa	8160
Arg Ile Thr Leu Pro Asp Phe Arg Leu Pro Glu Ile Ala Ile Pro Glu	
2705 2710 2715 2720	
ttc ata atc cca act ctc aac ctt aat gat ttt caa gtt cct gac ctt	8208
Phe Ile Ile Pro Thr Leu Asn Leu Asn Asp Phe Gln Val Pro Asp Leu	
2725 2730 2735	
cac ata cca gaa ttc cag ctt ccc cac atc tca cac aca att gaa gta	8256
His Ile Pro Phe Gln Leu Pro His Ile Ser His Thr Ile Glu Val	
2740 2745 2750	
cct act ttt ggc aag cta tac agt att ctg aaa atc caa tct cct ctt	8304
Pro Thr Phe Gly Lys Leu Tyr Ser Ile Leu Lys Ile Gln Ser Pro Leu	
2755 2760 2765	
ttc aca tta gat gca aat gct gac ata ggg aat gga acc acc tca gca	8352
Phe Thr Leu Asp Ala Asn Ala Asp Ile Gly Asn Gly Thr Thr Ser Ala	
2770 2775 2780	
aac gaa gca ggt atc gca gct tcc atc act gcc aaa gga gag tcc aaa	8400
Asn Glu Ala Gly Ile Ala Ala Ser Ile Thr Ala Lys Gly Glu Ser Lys	
2785 2790 2795 2800	
tta gaa gtt ctc aat ttt gat ttt caa gca aat gca caa ctc tca aac	8448
Leu Glu Val Leu Asn Phe Asp Phe Gln Ala Asn Ala Gln Leu Ser Asn	
2805 2810 2815	
cct aag att aat ccg ctg gct ctg aag gag tca gtg aag ttc tcc agc	8496
Pro Lys Ile Asn Pro Leu Ala Leu Lys Glu Ser Val Lys Phe Ser Ser	
2820 2825 2830	
aag tac ctg aga acg gag cat ggg agt gaa atg ctg ttt ttt gga aat	8544
Lys Tyr Leu Arg Thr Glu His Gly Ser Glu Met Leu Phe Phe Gly Asn	
2835 2840 2845	
gct att gag gga aaa tca aac aca gtg gca agt tta cac aca gaa aaa	8592
Ala Ile Glu Gly Lys Ser Asn Thr Val Ala Ser Leu His Thr Glu Lys	
2850 2855 2860	
aat aca ctg gag ctt agt aat gga gtg att gtc aag ata aac aat cag	8640
Asn Thr Leu Glu Leu Ser Asn Gly Val Ile Val Lys Ile Asn Asn Gln	
2865 2870 2875 2880	

ES 2 420 914 T3

ctt acc ctg gat agc aac act aaa tac ttc cac aaa ttg aac atc ccc Leu Thr Leu Asp Ser Asn Thr Lys Tyr Phe His Lys Leu Asn Ile Pro 2885 2890 2895	8688
aaa ctg gac ttc tct agt cag gct gac ctg cgc aac gag atc aag aca Lys Leu Asp Phe Ser Ser Gln Ala Asp Leu Arg Asn Glu Ile Lys Thr 2900 2905 2910	8736
ctg ttg aaa gct ggc cac ata gca tgg act tct tct gga aaa ggg tca Leu Leu Lys Ala Gly His Ile Ala Trp Thr Ser Ser Gly Lys Gly Ser 2915 2920 2925	8784
tgg aaa tgg gcc tcg ccc aga ttc tca gat gag gga aca cat gaa tca Trp Lys Trp Ala Ser Pro Arg Phe Ser Asp Glu Thr His Glu Ser 2930 2935 2940	8832
caa att agt ttc acc ata gaa gga ccc ctc act tcc ttt gga ctg tcc Gln Ile Ser Phe Thr Ile Glu Gly Pro Leu Thr Ser Phe Gly Leu Ser 2945 2950 2955 2960	8880
aat aag atc aat agc aaa cac cta aga gta aac caa aac ttg gtt tat Asn Lys Ile Asn Ser Lys His Leu Arg Val Asn Gln Asn Leu Val Tyr 2965 2970 2975	8928
gaa tct ggc tcc ctc aac ttt tct aaa ctt gaa att caa tca caa gtc Glu Ser Gly Ser Leu Asn Phe Ser Lys Leu Glu Ile Gln Ser Gln Val 2980 2985 2990	8976
gat tcc cag cat gtg ggc cac agt gtt cta act gct aaa ggc atg gca Asp Ser Gln His Val Gly His Ser Val Leu Thr Ala Lys Gly Met Ala 2995 3000 3005	9024
ctg ttt gga gaa ggg aag gca gag ttt act ggg agg cat gat gct cat Leu Phe Gly Glu Gly Lys Ala Glu Phe Thr Gly Arg His Asp Ala His 3010 3015 3020	9072
tta aat gga aag gtt att gga act ttg aaa aat tct ctt ttc ttt tca Leu Asn Gly Lys Val Ile Gly Thr Leu Lys Asn Ser Leu Phe Phe Ser 3025 3030 3035 3040	9120
gcc cag cca ttt gag atc acg gca tcc aca aac aat gaa ggg aat ttg Ala Gln Pro Phe Glu Ile Thr Ala Ser Thr Asn Asn Glu Gly Asn Leu 3045 3050 3055	9168
aaa gtt cgt ttt cca tta agg tta aca ggg aag ata gac ttc ctg aat Lys Val Arg Phe Pro Leu Arg Leu Thr Gly Lys Ile Asp Phe Leu Asn 3060 3065 3070	9216
aac tat gca ctg ttt ctg agt ccc agt gcc cag caa gca agt tgg caa Asn Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Ser Ala Gln Gln Ala Ser Trp Gln 3075 3080 3085	9264
gta agt gct agg ttc aat cag tat aag tac aac caa aat ttc tct gct Val Ser Ala Arg Phe Asn Gln Tyr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe Ser Ala 3090 3095 3100	9312
gga aac aac gag aac att atg gag gcc cat gta gga ata aat gga gaa Gly Asn Asn Glu Asn Ile Met Glu Ala His Val Gly Ile Asn Gly Glu 3105 3110 3115 3120	9360
gca aat ctg gat ttc tta aac att cct tta aca att cct gaa atg cgt	9408

ES 2 420 914 T3

Ala Asn Leu Asp Phe Leu Asn Ile Pro Leu Thr Ile Pro Glu Met Arg	
3125 3130 3135	
cta cct tac aca ata atc aca act cct cca ctg aaa gat ttc tct cta	9456
Leu Pro Tyr Thr Ile Ile Thr Thr Pro Pro Leu Lys Asp Phe Ser Leu	
3140 3145 3150	
tgg gaa aaa aca ggc ttg aag gaa ttc ttg aaa acg aca aag caa tca	9504
Trp Glu Lys Thr Gly Leu Lys Glu Phe Leu Lys Thr Thr Lys Gln Ser	
3155 3160 3165	
ttt gat tta agt gta aaa gct cag tat aag aaa aac aaa cac agg cat	9552
Phe Asp Leu Ser Val Lys Ala Gln Tyr Lys Lys Asn Lys His Arg His	
3170 3175 3180	
tcc atc aca aat cct ttg gct gtg ctt tgt gag ttt atc agt cag agc	9600
Ser Ile Thr Asn Pro Leu Ala Val Leu Cys Glu Phe Ile Ser Gln Ser	
3185 3190 3195 3200	
atc aaa tcc ttt gac agg cat ttt gaa aaa aac aga aac aat gca tta	9648
Ile Lys Ser Phe Asp Arg His Phe Glu Lys Asn Arg Asn Asn Ala Leu	
3205 3210 3215	
gat ttt gtc acc aaa tcc tat aat gaa aca aaa att aag ttt gat aag	9696
Asp Phe Val Thr Lys Ser Tyr Asn Glu Thr Lys Ile Lys Phe Asp Lys	
3220 3225 3230	
tac aaa gct gaa aaa tct cac gac gag ctc ccc agg acc ttt caa att	9744
Tyr Lys Ala Glu Lys Ser His Asp Glu Leu Pro Arg Thr Phe Gln Ile	
3235 3240 3245	
cct gga tac act gtt cca gtt gtc aat gtt gaa gtg tct cca ttc acc	9792
Pro Gly Tyr Thr Val Pro Val Val Asn Val Glu Val Ser Pro Phe Thr	
3250 3255 3260	
ata gag atg tcg gca ttc ggc tat gtg ttc cca aaa gca gtc agc atg	9840
Ile Glu Met Ser Ala Phe Gly Tyr Val Phe Pro Lys Ala Val Ser Met	
3265 3270 3275 3280	
cct agt ttc tcc atc ata ggt tct gac gtc cgt gtg cct tca tac aca	9888
Pro Ser Phe Ser Ile Ile Gly Ser Asp Val Arg Val Pro Ser Tyr Thr	
3285 3290 3295	
tta atc ctg cca tca tta gag ctg cca gtc ctt cat gtc cct aga aat	9936
Leu Ile Leu Pro Ser Leu Glu Leu Pro Val Leu His Val Pro Arg Asn	
3300 3305 3310	
ctc aag ctt tct ctt cca gat ttc aag gaa ttg tgt acc ata agc cat	9984
Leu Lys Leu Ser Leu Pro Asp Phe Lys Glu Leu Cys Thr Ile Ser His	
3315 3320 3325	
att ttt att cct gcc atg ggc aat att acc tat gat ttc tcc ttt aaa	10032
Ile Phe Ile Pro Ala Met Gly Asn Ile Thr Tyr Asp Phe Ser Phe Lys	
3330 3335 3340	
tca agt gtc atc aca ctg aat acc aat gct gaa ctt ttt aac cag tca	10080
Ser Ser Val Ile Thr Leu Asn Thr Asn Ala Glu Leu Phe Asn Gln Ser	
3345 3350 3355 3360	
gat att gtt gct cat ctc ctt tct tca tct tca tct gtc att gat gca	10128
Asp Ile Val Ala His Leu Leu Ser Ser Ser Ser Ser Val Ile Asp Ala	

ES 2 420 914 T3

3365										3370										3375										
ctg	cag	tac	aaa	tta	gag	ggc	acc	aca	aga	ttg	aca	aga	aaa	agg	gga		10176													
Leu	Gln	Tyr	Lys	Leu	Glu	Gly	Thr	Thr	Arg	Leu	Thr	Arg	Lys	Arg	Gly															
			3380						3385						3390															
ttg	aag	tta	gcc	aca	gct	ctg	tct	ctg	agc	aac	aaa	ttt	gtg	gag	ggt		10224													
Leu	Lys	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Phe	Val	Glu	Gly															
			3395						3400						3405															
agt	cat	aac	agt	act	gtg	agc	tta	acc	acg	aaa	aat	atg	gaa	gtg	tca		10272													
Ser	His	Asn	Ser	Thr	Val	Ser	Leu	Thr	Thr	Lys	Asn	Met	Glu	Val	Ser															
			3410						3415						3420															
gtg	gca	aaa	acc	aca	aaa	ccg	gaa	att	cca	att	ttg	aga	atg	aat	ttc		10320													
Val	Ala	Lys	Thr	Thr	Lys	Pro	Glu	Ile	Pro	Ile	Leu	Arg	Met	Asn	Phe															
			3425						3430						3440															
aag	caa	gaa	ctt	aat	gga	aat	acc	aag	tca	aaa	cct	act	gtc	tct	tcc		10368													
Lys	Gln	Glu	Leu	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Ser	Lys	Pro	Thr	Val	Ser	Ser															
			3445						3450						3455															
tcc	atg	gaa	ttt	aag	tat	gat	ttc	aat	tct	tca	atg	ctg	tac	tct	acc		10416													
Ser	Met	Glu	Phe	Lys	Tyr	Asp	Phe	Asn	Ser	Ser	Met	Leu	Tyr	Ser	Thr															
			3460						3465						3470															
gct	aaa	gga	gca	gtt	gac	cac	aag	ctt	agc	ttg	gaa	agc	ctc	acc	tct		10464													
Ala	Lys	Gly	Ala	Val	Asp	His	Lys	Leu	Ser	Leu	Glu	Ser	Leu	Thr	Ser															
			3475						3480						3485															
tac	ttt	tcc	att	gag	tca	tct	acc	aaa	gga	gat	gtc	aag	ggg	tcg	gtt		10512													
Tyr	Phe	Ser	Ile	Glu	Ser	Ser	Thr	Lys	Gly	Asp	Val	Lys	Gly	Ser	Val															
			3490						3495						3500															
ctt	tct	cgg	gaa	tat	tca	gga	act	att	gct	agt	gag	gcc	aac	act	tac		10560													
Leu	Ser	Arg	Glu	Tyr	Ser	Gly	Thr	Ile	Ala	Ser	Glu	Ala	Asn	Thr	Tyr															
			3505						3510						3520															
ttg	aat	tcc	aag	agc	aca	cgg	tct	tca	gtg	aag	ctg	cag	ggc	act	tcc		10608													
Leu	Asn	Ser	Lys	Ser	Arg	Ser	Ser	Val	Lys	Leu	Gln	Gly	Thr	Ser																
			3525						3530						3535															
aaa	att	gat	gat	atc	tgg	aac	ctt	gaa	gta	aaa	gaa	aat	ttt	gct	gga		10656													
Lys	Ile	Asp	Asp	Ile	Trp	Asn	Leu	Glu	Val	Lys	Glu	Asn	Phe	Ala	Gly															
			3540						3545						3550															
gaa	gcc	aca	ctc	caa	cgc	ata	tat	tcc	ctc	tgg	gag	cac	agt	acg	aaa		10704													
Glu	Ala	Thr	Leu	Gln	Arg	Ile	Tyr	Ser	Leu	Trp	Glu	His	Ser	Thr	Lys															
			3555						3560						3565															
aac	cac	tta	cag	cta	gag	ggc	ctc	ttt	ttc	acc	aac	gga	gaa	cat	aca		10752													
Asn	His	Leu	Gln	Leu	Glu	Gly	Leu	Phe	Phe	Thr	Asn	Gly	Glu	His	Thr															
			3570						3575						3580															
agc	aaa	gcc	acc	ctg	gaa	ctc	tct	cca	tgg	caa	atg	tca	gct	ctt	gtt		10800													
Ser	Lys	Ala	Thr	Leu	Glu	Leu	Ser	Pro	Trp	Gln	Met	Ser	Ala	Leu	Val															
			3585						3590						3600															
cag	gtc	cat	gca	agt	cag	ccc	agt	tcc	ttc	cat	gat	ttc	cct	gac	ctt		10848													
Gln	Val	His	Ala	Ser	Gln	Pro	Ser	Ser	Phe	His	Asp	Phe	Pro	Asp	Leu															
			3605						3610						3615															
ggc	cag	gaa	gtg	gcc	ctg	aat	gct	aac	act	aag	aac	cag	aag	atc	aga		10896													

ES 2 420 914 T3

Gly	Gln	Glu	Val	Ala	Leu	Asn	Ala	Asn	Thr	Lys	Asn	Gln	Lys	Ile	Arg	
			3620					3625					3630			
tgg	aaa	aat	gaa	gtc	cgg	att	cat	tct	ggg	tct	ttc	cag	agc	cag	gtc	10944
Trp	Lys	Asn	Glu	Val	Arg	Ile	His	Ser	Gly	Ser	Phe	Gln	Ser	Gln	Val	
		3635					3640					3645				
gag	ctt	tcc	aat	gac	caa	gaa	aag	gca	cac	ctt	gac	att	gca	gga	tcc	10992
Glu	Leu	Ser	Asn	Asp	Gln	Glu	Lys	Ala	His	Leu	Asp	Ile	Ala	Gly	Ser	
	3650					3655					3660					
tta	gaa	gga	cac	cta	agg	ttc	ctc	aaa	aat	atc	atc	cta	cca	gtc	tat	11040
Leu	Glu	Gly	His	Leu	Arg	Phe	Leu	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu	Pro	Val	Tyr	
	3665				3670					3675					3680	
gac	aag	agc	tta	tgg	gat	ttc	cta	aag	ctg	gat	gtc	acc	acc	agc	att	11088
Asp	Lys	Ser	Leu	Trp	Asp	Phe	Leu	Lys	Leu	Asp	Val	Thr	Thr	Ser	Ile	
			3685					3690						3695		
ggg	agg	aga	cag	cat	ctt	cgt	gtt	tca	act	gcc	ttt	gtg	tac	acc	aaa	11136
Gly	Arg	Arg	Gln	His	Leu	Arg	Val	Ser	Thr	Ala	Phe	Val	Tyr	Thr	Lys	
			3700				3705					3710				
aac	ccc	aat	ggc	tat	tca	ttc	tcc	atc	cct	gta	aaa	gtt	ttg	gct	gat	11184
Asn	Pro	Asn	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ile	Pro	Val	Lys	Val	Leu	Ala	Asp	
		3715					3720					3725				
aaa	ttc	att	att	cct	ggg	ctg	aaa	cta	aat	gat	cta	aat	tca	gtt	ctt	11232
Lys	Phe	Ile	Ile	Pro	Gly	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu	Asn	Ser	Val	Leu	
	3730					3735					3740					
gtc	atg	cct	acg	ttc	cat	gtc	cca	ttt	aca	gat	ctt	cag	gtt	cca	tcg	11280
Val	Met	Pro	Thr	Phe	His	Val	Pro	Phe	Thr	Asp	Leu	Gln	Val	Pro	Ser	
	3745				3750					3755				3760		
tgc	aaa	ctt	gac	ttc	aga	gaa	ata	caa	atc	tat	aag	aag	ctg	aga	act	11328
Cys	Lys	Leu	Asp	Phe	Arg	Glu	Ile	Gln	Ile	Tyr	Lys	Lys	Leu	Arg	Thr	
			3765					3770					3775			
tca	tca	ttt	gcc	ctc	acc	cta	cca	aca	ctc	ccc	gag	gta	aaa	ttc	cct	11376
Ser	Ser	Phe	Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Thr	Leu	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Pro	
			3780					3785				3790				
gaa	gtt	gat	gtg	tta	aca	aaa	tat	tct	caa	cca	gaa	gac	tcc	ttg	att	11424
Glu	Val	Asp	Val	Leu	Thr	Lys	Tyr	Ser	Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Leu	Ile	
		3795					3800				3805					
ccc	ttt	ttt	gag	ata	acc	gtg	cct	gaa	tct	cag	tta	act	gtg	tcc	cag	11472
Pro	Phe	Phe	Glu	Ile	Thr	Val	Pro	Glu	Ser	Gln	Leu	Thr	Val	Ser	Gln	
	3810					3815					3820					
ttc	acg	ctt	cca	aaa	agt	gtt	tca	gat	ggc	att	gct	gct	ttg	gat	cta	11520
Phe	Thr	Leu	Pro	Lys	Ser	Val	Ser	Asp	Gly	Ile	Ala	Ala	Leu	Asp	Leu	
	3825				3830				3835					3840		
aat	gca	gta	gcc	aac	aag	atc	gca	gac	ttt	gag	ttg	ccc	acc	atc	atc	11568
Asn	Ala	Val	Ala	Asn	Lys	Ile	Ala	Asp	Phe	Glu	Leu	Pro	Thr	Ile	Ile	
			3845					3850					3855			
gtg	cct	gag	cag	acc	att	gag	att	ccc	tcc	att	aag	ttc	tct	gta	cct	11616
Val	Pro	Glu	Gln	Thr	Ile	Glu	Ile	Pro	Ser	Ile	Lys	Phe	Ser	Val	Pro	

ES 2 420 914 T3

3860	3865	3870	
gct gga att gtc att cct tcc ttt caa gca ctg act gca cgc ttt gag Ala Gly Ile Val Ile Pro Ser Phe Gln Ala Leu Thr Ala Arg Phe Glu 3875 3880 3885			11664
gta gac tct ccc gtg tat aat gcc act tgg agt gcc agt ttg aaa aac Val Asp Ser Pro Val Tyr Asn Ala Thr Trp Ser Ala Ser Leu Lys Asn 3890 3895 3900			11712
aaa gca gat tat gtt gaa aca gtc ctg gat tcc aca tgc agc tca acc Lys Ala Asp Tyr Val Glu Thr Val Leu Asp Ser Thr Cys Ser Ser Thr 3905 3910 3915 3920			11760
gta cag ttc cta gaa tat gaa cta aat gtt ttg gga aca cac aaa atc Val Gln Phe Leu Glu Tyr Glu Leu Asn Val Leu Gly Thr His Lys Ile 3925 3930 3935			11808
gaa gat ggt acg tta gcc tct aag act aaa gga aca ctt gca cac cgt Glu Asp Gly Thr Leu Ala Ser Lys Gly Thr Leu Ala His Arg 3940 3945 3950			11856
gac ttc agt gca gaa tat gaa gaa gat ggc aaa tat gaa gga ctt cag Asp Phe Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Lys Tyr Glu Gly Leu Gln 3955 3960 3965			11904
gaa tgg gaa gga aaa gcg cac ctc aat atc aaa agc cca gcg ttc acc Glu Trp Glu Gly Lys Ala His Leu Asn Ile Lys Ser Pro Ala Phe Thr 3970 3975 3980			11952
gat ctc cat ctg cgc tac cag aaa gac aag aaa ggc atc tcc acc tca Asp Leu His Leu Arg Thr Gln Lys Asp Lys Gly Ile Ser Thr Ser 3985 3990 3995 4000			12000
gca gcc tcc cca gcc gta ggc acc gtg ggc atg gat atg gat gaa gat Ala Ala Ser Pro Ala Val Gly Thr Val Gly Met Asp Met Asp Glu Asp 4005 4010 4015			12048
gac gac ttt tct aaa tgg aac ttc tac tac agc cct cag tcc tct cca Asp Asp Phe Ser Lys Trp Asn Phe Tyr Tyr Ser Pro Gln Ser Ser Pro 4020 4025 4030			12096
gat aaa aaa ctc acc ata ttc aaa act gag ttg agg gtc cgg gaa tct Asp Lys Lys Leu Thr Ile Phe Lys Thr Glu Leu Arg Val Arg Glu Ser 4035 4040 4045			12144
gat gag gaa act cag atc aaa gtt aat tgg gaa gaa gag gca gct tct Asp Glu Glu Thr Gln Ile Lys Val Asn Trp Glu Glu Glu Ala Ala Ser 4050 4055 4060			12192
ggc ttg cta acc tct ctg aaa gac aac gtg ccc aag gcc aca ggg gtc Gly Leu Leu Thr Ser Leu Lys Asp Asn Val Pro Lys Ala Thr Gly Val 4065 4070 4075 4080			12240
ctt tat gat tat gtc aac aag tac cac tgg gaa cac aca ggg ctc acc Leu Tyr Asp Tyr Val Asn Lys Tyr His Trp Glu His Thr Gly Leu Thr 4085 4090 4095			12288
ctg aga gaa gtg tct tca aag ctg aga aga aat ctg cag aac aat gct Leu Arg Glu Val Ser Ser Lys Leu Arg Arg Asn Leu Gln Asn Asn Ala 4100 4105 4110			12336
gag tgg gtt tat caa ggg gcc att agg caa att gat gat atc gac gtg			12384

ES 2 420 914 T3

Glu Trp Val Tyr Gln Gly Ala Ile Arg Gln Ile Asp Asp Ile Asp Val	
4115 4120 4125	
agg ttc cag aaa gca gcc agt ggc acc act ggg acc tac caa gag tgg	12432
Arg Phe Gln Lys Ala Ala Ser Gly Thr Thr Gly Thr Tyr Gln Glu Trp	
4130 4135 4140	
aag gac aag gcc cag aat ctg tac cag gaa ctg ttg act cag gaa ggc	12480
Lys Asp Lys Ala Gln Asn Leu Tyr Gln Glu Leu Leu Thr Gln Glu Gly	
4145 4150 4155 4160	
caa gcc agt ttc cag gga ctc aag gat aac gtg ttt gat ggc ttg gta	12528
Gln Ala Ser Phe Gln Gly Leu Lys Asp Asn Val Phe Asp Gly Leu Val	
4165 4170 4175	
cga gtt act caa aaa ttc cat atg aaa gtc aag aag ctg att gac tca	12576
Arg Val Thr Gln Lys Phe His Met Lys Val Lys Lys Leu Ile Asp Ser	
4180 4185 4190	
ctc att gat ttt ctg aac ttc ccc aga ttc cag ttt ccg ggg aaa cct	12624
Leu Ile Asp Phe Leu Asn Phe Pro Arg Phe Gln Phe Pro Gly Lys Pro	
4195 4200 4205	
ggg ata tac act agg gag gaa ctt tgc act atg ttc atg agg gag gta	12672
Gly Ile Tyr Thr Arg Glu Glu Leu Cys Thr Met Phe Met Arg Glu Val	
4210 4215 4220	
ggg acg gta ctg tcc cag gta tat tgc aaa gtc cat aat ggt tca gaa	12720
Gly Thr Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Val His Asn Gly Ser Glu	
4225 4230 4235 4240	
ata ctg ttt tcc tat ttc caa gac cta gtg att aca ctt cct ttc gag	12768
Ile Leu Phe Ser Tyr Phe Gln Asp Leu Val Ile Thr Leu Pro Phe Glu	
4245 4250 4255	
tta agg aaa cat aaa cta ata gat gta atc tgc atg tat agg gaa ctg	12816
Leu Arg Lys His Lys Leu Ile Asp Val Ile Ser Met Tyr Arg Glu Leu	
4260 4265 4270	
ttg aaa gat tta tca aaa gaa gcc caa gag gta ttt aaa gcc att cag	12864
Leu Lys Asp Leu Ser Lys Glu Ala Gln Glu Val Phe Lys Ala Ile Gln	
4275 4280 4285	
tct ctc aag acc aca gag gtg cta cgt aat ctt cag gac ctt tta caa	12912
Ser Leu Lys Thr Thr Glu Val Leu Arg Asn Leu Gln Asp Leu Leu Gln	
4290 4295 4300	
ttc att ttc caa cta ata gaa gat aac att aaa cag ctg aaa gag atg	12960
Phe Ile Phe Gln Leu Ile Glu Asp Asn Ile Lys Gln Leu Lys Glu Met	
4305 4310 4315 4320	
aaa ttt act tat ctt att aat tat atc caa gat gag atc aac aca atc	13008
Lys Phe Thr Tyr Leu Ile Asn Tyr Ile Gln Asp Glu Ile Asn Thr Ile	
4325 4330 4335	
ttc aat gat tat atc cca tat gtt ttt aaa ttg ttg aaa gaa aac cta	13056
Phe Asn Asp Tyr Ile Pro Tyr Val Phe Lys Leu Leu Lys Glu Asn Leu	
4340 4345 4350	
tgc ctt aat ctt cat aag ttc aat gaa ttt att caa aac gag ctt cag	13104
Cys Leu Asn Leu His Lys Phe Asn Glu Phe Ile Gln Asn Glu Leu Gln	

ES 2 420 914 T3

4355	4360	4365	
gaa gct tct caa gag tta cag cag atc cat caa tac att atg gcc ctt Glu Ala Ser Gln Glu Leu Gln Gln Ile His Gln Tyr Ile Met Ala Leu 4370 4375 4380			13152
cgt gaa gaa tat ttt gat cca agt ata gtt ggc tgg aca gtg aaa tat Arg Glu Glu Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Val Gly Trp Thr Val Lys Tyr 4385 4390 4395 4400			13200
tat gaa ctt gaa gaa aag ata gtc agt ctg atc aag aac ctg tta gtt Tyr Glu Leu Glu Glu Lys Ile Val Ser Leu Ile Lys Asn Leu Leu Val 4405 4410 4415			13248
gct ctt aag gac ttc cat tct gaa tat att gtc agt gcc tct aac ttt Ala Leu Lys Asp Phe His Ser Glu Tyr Ile Val Ser Ala Ser Asn Phe 4420 4425 4430			13296
act tcc caa ctc tca agt caa gtt gag caa ttt ctg cac aga aat att Thr Ser Gln Leu Ser Ser Gln Val Glu Gln Phe Leu His Arg Asn Ile 4435 4440 4445			13344
cag gaa tat ctt agc atc ctt acc gat cca gat gga aaa ggg aaa gag Gln Glu Tyr Leu Ser Ile Leu Thr Asp Pro Asp Gly Lys Gly Lys Glu 4450 4455 4460			13392
aag att gca gag ctt tct gcc act gct cag gaa ata att aaa agc cag Lys Ile Ala Glu Leu Ser Ala Thr Ala Gln Glu Ile Ile Lys Ser Gln 4465 4470 4475 4480			13440
gcc att gcg acg aag aaa ata att tct gat tac cac cag cag ttt aga Ala Ile Ala Thr Lys Lys Ile Ile Ser Asp Tyr His Gln Gln Phe Arg 4485 4490 4495			13488
tat aaa ctg caa gat ttt tca gac caa ctc tct gat tac tat gaa aaa Tyr Lys Leu Gln Asp Phe Ser Asp Gln Leu Ser Asp Tyr Tyr Glu Lys 4500 4505 4510			13536
ttt att gct gaa tcc aaa aga ttg att gac ctg tcc att caa aac tac Phe Ile Ala Glu Ser Lys Arg Leu Ile Asp Leu Ser Ile Gln Asn Tyr 4515 4520 4525			13584
cac aca ttt ctg ata tac atc acg gag tta ctg aaa aag ctg caa tca His Thr Phe Leu Ile Tyr Ile Thr Glu Leu Leu Lys Lys Leu Gln Ser 4530 4535 4540			13632
acc aca gtc atg aac ccc tac atg aag ctt gct cca gga gaa ctt act Thr Thr Val Met Asn Pro Tyr Met Lys Leu Ala Pro Gly Glu Leu Thr 4545 4550 4555 4560			13680
atc atc ctc taa tttttttaaa agaaatcttc atttattctt cttttccaat Ile Ile Leu *			13732
tgaactttca catagcacag aaaaaattca aactgcctat attgataaaa ccatacagtg			13792
agccagcctt gcagtaggca gtagactata agcagaagca catatgaact ggacctgcac			13852
caaagctggc accagggctc ggaaggtctc tgaactcaga aggatggcat tttttgcaag			13912
ttaaagaaaa tcaggatctg agttattttg ctaaacttgg gggaggagga acaaataaat			13972
ggagtcttta ttgtgtatca t			13993

<210> 319

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido antisentido

<400> 319

gcctcagtct gcttcgcgcc 20

5 <210> 320
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 320

15 gctcactgtt cagcatctgg 20
<210> 321
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 321

25 tgagaatctg ggcgaggccc 20
<210> 322
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 322

35 gtccttcata ttgccatct 20
<210> 323
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 323

45 cctccctcat gaacatagtg 20
<210> 324
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 324

55 gacgtcagaa cctatgatgg 20
<210> 325
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 324

65 gacgtcagaa cctatgatgg 20
<210> 325
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 5 <400> 325
 tgagtgagtc aatcagcttc 20
 <210> 326
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 326
 gccttctgct tgagttacaa 20
 20 <210> 327
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 327
 30 gcgccttctg cttgagttac 20
 <210> 328
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 328
 tcgcgccttc tgcttgagtt 20
 45 <210> 329
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 329
 55 cttcgcgcct tctgcttgag 20
 <210> 330
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 65 <400> 330

agtgtgcttc gcgcttctg 20
 <210> 331
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 10 <400> 331
 tcagtctgct tcgcgcttc 20
 15 <210> 332
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 332
 25 cctcagtctg cttcgcgct 20
 <210> 333
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 35 <400> 333
 agcctcagtc tgcttcgctg 20
 <210> 334
 40 <211> 43445
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 334
 45 accaagacag cgctcaggac tggttctcct cgtggctccc aattcagtcc aggagaagca 60
 gagattttgt ccccatggtg ggtcatctga agaaggcacc cctggtcagg gcaggcttct 120
 cagaccctga ggcgctggcc atggcccccac tgagacacag gaagggccgc gccagagcac 180
 tgaagacgct tggggaaggg aaccacactg ggaccagcc cctgggtggct gcggtgcat 240
 cccagggtggg cccctcccc gaggtcttcc aagggtcaaa gagaagccag ttagaaaaag 300
 caaacaggtc aggcccgga ggcgccttt ggaccttttg caatcctggc gctcttgag 360
 cctgggcttc ctataaatgg ggtgcggcg ccggccgcgc attcccaccg ggacctgcgg 420
 ggctgagtgc cttctcgggt tgctgccgct gaggagcccg cccagccagc cagggccgcg 480
 aggccgaggc caggccgcag cccaggagcc gcccaccgc agctggcgat ggaccgcgcg 540

ES 2 420 914 T3

aggcccgcg	tgctggcgct	gctggcgctg	cctgcgctgc	tgctgctgct	gctggcgggc	600
gccagggg	gtgagtgcgc	ggccgctctg	cgggcgcaga	gggagcgggg	gggagccggc	660
ggcacgaggt	tggccggggc	agcctggggc	taggccagag	ggagggcagc	cacaggggtcc	720
agggcgagtg	gggggatttg	accagctggc	ggcccctgca	ggctcaggat	ggggggcgcg	780
ggatggaggg	gctgaggagg	gggtctccgg	agcctgcctc	cctcctgaaa	ggtgaaacct	840
gtgccgggtg	tccccctgtc	gggccctagc	acccgctggg	aagacgtggg	aagctcacag	900
atttctttct	cctgtcttac	agaagaggaa	atgctggaaa	atgtcagcct	ggtctgtcca	960
agtaaggcat	ctgcgcattg	ggcgtggaag	ggcgcccagc	cccgtgcact	ctcctacacc	1020
cgggtccctg	agggcctccc	actctacagg	gctgagatgg	catcgtgggt	tgcccttgctc	1080
tgaccccagg	aagcaagttc	cctgagcctc	tgcccacacc	caaggggatgc	caactctctt	1140
ctacctggcc	tctgtttctg	tcccaaaagt	tcagcctggg	ggcggggggag	ggaaggggatt	1200
gtctctccgc	tggcctgtgc	acactttgaa	gaaacatcac	tgtcctgttt	atcagtgact	1260
agtcattgat	tcgaagcatg	tgaggggtgag	gaaatactga	ctttaacctt	tgtgaagaaa	1320
tcgaacctcc	acccccttcc	tatttacctg	acccctgggg	gttaaaggaa	ctggcctcca	1380
agcgcgaccc	tgtgtgctgg	agccgcgggg	cggacttctg	atggggcagc	accgccatct	1440
agtggccgtc	tgtcatcact	gcagctygac	tcaggaccca	gatgttcttt	ttcttcaatt	1500
gttcagaaaa	ttcctctcaa	ctacagtggg	aacctccaga	aattcttttc	taggagtttg	1560
ttaagttagt	tacgcttaat	gcttaatgaa	ctttgcctta	agtatttggt	agtcttagag	1620
tcacggaatt	acggcggtgt	caagctaaaa	aagcattaga	gatagtacta	tttgcgtaat	1680
gttgtcatct	cttaatttgc	cagaggggtct	ctcatgcaga	ttttctgagc	cccattactt	1740
gacacttgtc	actcccttcc	ctgtgcctca	gatgagatat	tcaagacatg	ccagccaatt	1800
taaacattag	cctcagcaaa	aacataatgg	agaagtcaaa	tctataaagg	aaaattaagt	1860
ataaagtcaa	ttaaaaaata	atttgayttg	aattaccatt	tttaattctc	tatgccactg	1920
ccctctctctg	cccagaattg	gctgtccttg	ggagagctat	ttctgctatg	tggtgacgt	1980
atttctcccc	acgttagaag	atgcgacccg	attcaagcac	ctccggaagt	acacatacaa	2040
ctatgaggct	gagagtcca	gtggagtccc	tgggactgct	gattcaagaa	gtgccaccag	2100
gatcaactgc	aaggtatgga	ggatgcaggc	aggagggacc	tagagcccac	agctttcccc	2160
cagccctgtt	ccagcggg	cccaacacgc	gaccttcccg	gaggggtgtg	actgagcaaa	2220
cgcagaacat	cccagaactg	ttgtaatctg	atcaaagcac	tgggactttg	cctctgtttg	2280
taagtcagcc	acattgctga	gatgtggtct	gccccacca	aatttcgcaa	gtcagaagta	2340
ttttcccggt	aacttcccag	atgcaatagg	aatccatgat	ctagattagc	agcagtggtg	2400
gtctgtagat	ttcagcgtga	qagagggcca	gtaggtgagc	tatgggaggc	aggcaactcg	2460

gaatcgcaact gtgaaatgca gtttttataa ttttaagtcaa acagaatctg ttgctgaaaa 2520
 atgaatggaa agaagaaaaa aatataaaca tacagtttgt tctaaaataa aactttgctt 2580
 attattgaga ctgggtgtac tcatgttaca tacaigtgga gcagatctac aggctgctat 2640
 tgggggtttg gtggggaaga gaagtcaagc tgagcagtc ccttttttta gagagtaccg 2700
 tagctcttgt atgtgctgtc caatatggta gacatgagcc acattgggct attttaatgg 2760
 aatgaaatta aaaattcata ttcgttgtca cattagctgc atttcaactg ctcaacagcc 2820
 accctggcta ctggctccca tattgaacag cacacatgta caacatttct ataaagttat 2880
 ttgaatagtgt ctggataata agtaggaatc cgttgaaact ccagctatat gcaaagctct 2940
 aaataggccc taatagatat aaccagtttt ttgggtgaca ttaaggagac atttgctgtg 3000
 gaaacgaagg atggccctct tctgcttttc tgtttttctt cttcactttc actcctagtc 3060
 tgcagcgctt ctatttaacc acagctcttt ataattaaag tgagtaactt tagaaccaat 3120
 aaaaggacat cctccttccc atgcctaggg gcaaacttaa gaaatgtgtt acccgaggag 3180
 gggaaaacgt cagcaatagg actaagtcta ggttggtgca cagagaacct aggaggcatg 3240
 ttgataaggc atgtggtgtt gaggcgcagg cagtgggtgt cccagcacca ttccctttgg 3300
 tgctctgatt agagattaag ccctgggctt caggggccac ctctcattct tgatagacaa 3360
 cctcaatgct ctgctacct gaattctcag gttgagctgg aggttcccca gctctgcagc 3420
 ttcactctga agaccagcca gtgcacctg aaagaggtgt atggcttcaa ccctgagggc 3480
 aaagccttgc tgaagaaaac caagaactct gaggagtgtg ctgcagccat gtccaggtaa 3540
 gtcattgtgt acatgagcac acgcatgtgt gtgtytccgc tgaggtatga acttgtgtgt 3600
 ttgcaccagg caggatgtg actgtaagta tttgtattcc gtatccatcg tggatcaggg 3660
 aattactgag ttttcacaat catcaaaaag agagaagcat tagttaacct tccctagtta 3720
 ggttccctta attatcattt tcatgtgttt ctaaaaatct catgctttaa acttcttgag 3780
 attataaaac tgagatgctt tgtttaaaca agtgaattct tatttaaaga actagtcaag 3840
 actagtgtt ggtggtcttt ggtgtggggc cccagaggca ctggctgctg tggccggcac 3900
 atggcggggc agggctctgt caccgcaggc cagaggagca ccaaggcttc ggtggctccc 3960
 cctcctaggc tggcattcag ccaactgcag ctgatcggcc actgcagctg catctctgct 4020
 gactggctag gggccatgtc gcacccattg taaatatatt caacatcacc cctgcctcat 4080
 cctcaatcac agttttagg gtccctagggt tgtatgaata caggcaggat agagttgtta 4140
 acttggtagc atcagaaaac tctgtctgta ttagtctgtt ttcattgctg tgataaagac 4200
 atacctgaga ctgggcaatt taaaaagaa aggtttattg gactcacagt tccacgtggc 4260
 tggggaggtc tcacaatcat ggcggaaggt gagggacagc aagtcacatc ttatgtagat 4320
 ggtggctggc aaagagagct tgtgcagaga aactcctgtt tttagaacca tcagatctcc 4380

cgacacccat ctgcaatcac gagaacagca cgggaaagac ctgcccccat gattcaatca 4440
cctccccccg ggtccctccc acaacacgtg ggaattatga gagctacgag acgaaatttg 4500
ggtggggacg cagagccaaa ccataatcac atccttgccc atttttcagt tttgctaaac 4560
attagattca gatgccagtc ctttcttgcc aaaataggct gtgaggcttc tttctttcct 4620
atgctttatt ttctccaaga cttaactgta tatgaggag aggggtatgg tggcaggagg 4680
aaagagtggg ttatTTTTTg gtccttggtc ttctccaaat acagaagaga ctctgtttct 4740
tgaaaaggag ggctttccat gtttgcattc tcatgacttt aactgtcttt tttaaaaatt 4800
gacatacaat aattatacat atttattgag aacatagtga tattttgata catgtaattg 4860
atggtgatca gatcagagta attagcatac ccatcatctc aaacatttat catttcttcg 4920
tggtgggaac tttctgagag agtgtaggct gtgggagata agtccgtcac cttttcctcc 4980
tgatgtaacc agagtggctg cagccaggtc ctccagaaact cagagagtac ccagtgggaa 5040
atccctaaga ccaaagtcag catgggcttc agccatggcc tgacaccata caaaagaatg 5100
actgtccaac aagtgtatga aaataagctc caattcactg gtagtcaaga aatgcgaatt 5160
aatgtaacaa caagatatTT atctgctttt acccatcata ctgcaaaact ggaaaacagt 5220
gatagcacct gttgctggca ggccagttag gaaaagtgtg ctgtcctgag ctgctggtag 5280
aaacgagagc catcaggcaa tatctactgt aattttaaatt acttaataacc ctttgacaca 5340
gatatttttag tctttgggac tctagcccat gaaaataaaa gcagtaattg gtgaagatag 5400
gcacataagg atgtttgttt tggtagtgtt tgtgtggttt aaaaaaaatc cagaaagaga 5460
gagggcaaat gccatcaaat ggggcaatgt gtgaataaat tatatttagc catggaatgg 5520
aatgttctgc atgcagcttt taaaaaaatc tgtagagct gtaccaagtg actcagaagg 5580
atTTTTgtga agtataatta agtgagaaaa acaagataaa agtatgcata atacaatgcc 5640
acttgataaa aacaaacaat ggcaaaatct ttgtatgact ctgtttgcac tcacccatgt 5700
ttacagagga ttgtatgagt gtgcagaaac aaatggaaca accactcggg tgtccgtatg 5760
gggaggatgg gcaaagagac tgatatgggt ggagaacaga gcagggtctg atgagccaag 5820
caaaaaaagt taaaacacag ctggacctgg tggctcatgc ctgtagtccc agcactttgg 5880
gagggcaggg agggagaatc acctgaggtc aggagtttga gaccagcctg gccaacatgg 5940
tgaaaactgt ctctactaaa aatacaaaaa ttagctgggt gtgatggcac atgccagtag 6000
tcctagctac tccggaggct gaggcaggag aatcacttga tcccaggagg tggaggttgc 6060
agttagctga ggttgcgcca ttgcactcca gccggggcga ccgagcgaga ctccatttca 6120
aaaaaagaaa aagaaaaaag aaaaaaagaa aaaaaaagaa tcaccaaaac ttatgtatat 6180
gtgcatactt ttttgaaaat gtatgtctat gtgtagctat attctatatatt taaaaataaa 6240
tgatgtcaga agaacaattg gttaaaaaaa tatgagaaaa gaaacttcag tgccaccag 6300

ctacttcca gcaagttgta atggagaagg acatttccgt gaccatectc tctctgggac 6360
 aggtatgagc tcaagctggc cattccagaa gggagcagg ttttccttta cccggagaaa 6420
 gatgaacctt cttacatcct gaacatcaag aggggcatca tttctgccct cctgggtccc 6480
 ccagagacag aagaagccaa gcaagtgttg tttctggtga ggatttagaa agctgatagc 6540
 agtggccctt gaaactcatc ttcattgtgt agagaccagt cctaccatat acaaagcaga 6600
 tcaactgagc agctccatga ctagttacat aggaagccct ggattggcgt gaaatactgg 6660
 tgcccagagt tcttcctgcc ccttaggctc actgacagat catccaagc aggcctatca 6720
 ggttgggtct aattttaaaa cagtcattga ggagtcctgg ccaccccacc cctgcttttg 6780
 tttgatgctt cacctgtgtt tgetgggtta tgggtgtacac agtaaactct gtgtgtattt 6840
 taaacaccaa aaataatggg atctgttget ggtctctttt acgaatttca ggtttcactg 6900
 tgagacagaa ttcatttcac ctcaagtcct tgagcacttt tgtgtgttct aatttctcta 6960
 cgacaccata atggggagaag acaccgatgc aacctgcgga ggcttttctg cagaccacc 7020
 ttttaactgt tttctctctc ccaacttggg ctggccaggc actagcaaga ccacactctg 7080
 cataggaaga aaaagaaagt cctcccaaaa gctagattcc tctgtctttt tctttcacga 7140
 tcccacccc atccctccca agtacccaag gatgttgccc gtgttgaata catgtggttg 7200
 catcttcttc ctccatagga taccgtgtat ggaaactgtt ccaactcactt taccgtcaag 7260
 acgaggaagg gcaatgtggc aacagaaata tccactgaaa gagacctggg gcagtgtgat 7320
 cgcttcaagc ccattccgac aggcattcag ccacttgcct tcatcaaagg catggttaagt 7380
 cccatgtcag cactgtcgtg cacagcaagg agcatcctct tat'taatata attccagaac 7440
 ttttgagcta gtgggcacct ttgaggacag cctgccctgg ctgtttttta tacagactag 7500
 agataggacc ctgagcaggc acgggaaggt ctgcccaggc ttacaggcct gggatcagtt 7560
 gagccaaggc ttgagtcagg ctctccctc ccagcccaga getctgtctt tctcctgtc 7620
 cttctgtcac tggcaccaaa ctgcctctaa tctcatcact tgagagtaat gactactcac 7680
 ctctgagaag gttccgggga tggatgtagg gcagcaaaac caccttctgt tcttttctgc 7740
 acaaggactc cttgtgccag ctccaagcct ctggcctttg aagaagtccc aagacctgtg 7800
 ttctccccc ctccctcatc ccatgaagtg gagtgactta gagtgcctca gcttcttgc 7860
 cttccacccc cagtaaccac ctgaccaaac atggcccccac tgccaccggc ctggagcacc 7920
 ctctcctctc tgttaactgg ggccatggag caccatatta cctgagcctg cctgaccct 7980
 gcaacatctt cctgatatg agccccagcc tgtctcagtg aacatgaata acttgggcaa 8040
 tcaactgtcat gctgggcgtt gttcctgtc attgtcctta gggttgaaaa caggagctct 8100
 gatgaccatg agtgccacag tcagaagagg ataatgact ggcttagggg tcttttctga 8160
 gcatctgctg tttgtcaac ccactctgg gcagcaccaa ggaagggaca gtggcagatg 8220

aaccatggac cttcccctca ggatgcttcc agtctaattgc aggagccagg tcaataaagt 8280
atacgtggta tactcaataa ggtgataagc tgaacagtgc agacaagaag tcctgggcct 8340
gaccaggaag gagaaagaat tattcatgta gctcagcggg caacatttca tggaagatgt 8400
ggagcaggaa cccaaaaaat gcaaagaata tgtaaatgaa agagacatgt aagaatgggc 8460
ttttgggcaa agaaaagtta ctgagcaggt gtgtgagggg ctatgtggtg ggatgggcat 8520
gtggaggata caaagttag acattgtcca gtgaggggtg aaaaagagga gtctacagct 8580
tgactcagct ttggggatgc cgacttgttg caccacctgg tctaaatgtc aagtaccag 8640
ttatcttctt tctctgagtt tatctagtgg tacaggactc ctgctccctt ctaccttgaa 8700
ggtaaatgct tttaacagaa gatacaggga ctgatcaaaa tgctcgtctc caatctcttt 8760
catagacccg ccccttgta actctgatca gcagcagcca gtctgtcag tacacactgg 8820
acgctaagag gaagcatgtg gcagaagcca tctgcaagga gcaacacctc ttctgcctt 8880
tctctacaa gtaggtcatg tgatgcaccc ctgatttgtc atttaatggg tcagtgtgaa 8940
ctgaacactt ctcaagtgtc ctgttccagg caaacctgtg cctgggaggg aggaatggag 9000
agggataaaa tgccgcccct ccctgtcccc ctttttaagc gaacaggcca tttggcagaa 9060
aagtcctagg catgcaaaac aatccaagac caacaaaaga tatctaagac ccattcttta 9120
agggctgtag atccagaaaa cctgaggatc actgcagggt accctggtta gaaaaggttt 9180
catggaagat ttgggatact gactggaaac ttgtgtatcc aaatccactt tgaaaactga 9240
taacaatga atatataatt agtaactgcc atattcttgg ctctatgttg tggaagatac 9300
gaaagaattt tgagacattg cactagtctc tacctctggc cactccagac tagtggagag 9360
tataaggcac gcatgtcttt ttgatgggag gataactagc gtgaccagga agaggtagat 9420
gttattcatt cagggccaac aatggctgga tttaacctg ctttgaaaga tgggcaggac 9480
ttgggtagat gcagagacag ggaaaacctt caacatggaa agaatagtat gttctggcca 9540
tccgtgacat ggtgtgcttc cttggttacc aggaataagt atgggatggg agcacaagtg 9600
acacagactt tgaaaactga agacacacca aagatcaaca gccgcttctt tggatgaagg 9660
aagagtctct gtccacatag ttgctggaaa atctactcaa gatgtgccta tcatggctta 9720
gccacttgct gagccctggt aaatgtctgc tgactaacia gtgatacaga cactgggtgtt 9780
ctggctacct ctagttagaa agcaaactca tttcatgatg tcaagttgca atggcataaa 9840
ggaaaagaag ttcccaaagc tacttaggca ttgttaaata gaaaactgga atcctaagtt 9900
taacatgaca tatttgatag aactgacatc accatcctg tgataagatc cagagctgtc 9960
ccagacgagg tggaccaagt gggagagaac cttcagagtc tggccagata gtaacctcag 10020
gagtcagtct ttagaggtag aaggaaactc aacaatctca agtccaacct ttaccagta 10080
ttgtattgta tttatatctg tccaaattcc ttcttgtaca ttacctcatt gtcctttttg 10140
ctcatagcaa cctgtgatgt caggtggtag agatgtgatt ttatacctat tctacagagg 10200

agacagtgac acagagagggc ttagagtttg atgtagtcaa ggccgcagaa tattagaggg 10260
 gggaaaataa gtgccaggtt gtaatctaag ccaggactat tctcattaca ccacatttcc 10320
 atgatgactt ttacctctct tctggcata ggtcacagta ggtggtggag aggatacaaa 10380
 agtgtctccc ctcccacaa gctgctggtg gacccaatta gaagaaatgg tgataagcac 10440
 ccatgtgcct ggtccaggtt gtaaccatgt caacagtagc acctctcac caattatttc 10500
 aagctaaggg taacctgatg atagactcag acaagtctgg attccacttt agctctacct 10560
 cttagacctt gagagctctt gggaaaccta agttgctcat ctctgggtca cacttctca 10620
 tctctgggtc tcatctcttt gtctcatctc tgggactcag agctgagatc cagggatgag 10680
 caatttacat ggcccaaaaa ctctgtgggt ctgagaagca gggtgaatt tatcattaaa 10740
 ttgaacaata atgccacccc acagggatag gatgatgagt cagtgaanaa aagtcaatca 10800
 cctatggcag agccagatct agcaggcatt gaatacagga tagtttcttt cccttttccc 10860
 ctgtgctgat actccacaat ttccagcttc cagtagacaa agatatggtt gagatgaaga 10920
 aagctagagt tcttttgaca ctttccatct tccaggtagt aagaagatgg gcctcgatt 10980
 tgagagcacc aaatccacat cacctccaaa gcaggccgaa gctgttttga agactctcca 11040
 ggaactgaaa aaactaacca tctctgagca aaatatccag agagctaata tcttcaataa 11100
 gctggttact gagctgagag gcctcagtga tgaagcagtc acatctctct tgccacagct 11160
 gattgaggtg tccaggtatc taatggttac agctcaactt ttataaaaac tgatggtaac 11220
 tgactgaact ttcaaactt ggccaaatgg agaattctag ggaccatttg gatatacaatc 11280
 cagttaataa attagtcaat cagttcatga ttgctggata gagaactatc agctgctgcg 11340
 ctgagttcca tgaaacacac acgcgcatac tgtgttcaag gcagctatgt atttgtgtgt 11400
 taaaacagaa ggagaatagt tcccacattt tgatgggtaa cttttaattc ctaggctctat 11460
 tgcaggtgct ctccagaagc ttataggctg gtggagagag aactcagacg aaaaatataa 11520
 tatgatttct ctacccttca aggcactggc tttaagtgt atgaaggtga gagaagggac 11580
 tgaggccagg aatgagacc agctaattgt ggccaggcat attctgtgtg ctggccaaag 11640
 gactgtgata acagtcttct tgttgctaca gatccacagt cccctcttgg aacttttctc 11700
 gattgggctt cttctgtggg taatattcct aaggaaagca tcatggttct gagctccaag 11760
 ttgggttttg aagttagatt tgaatagtga atgaggtgat taagggtctc cctggcagag 11820
 gacacaccat gagcaatatt ttatgtgccc tgaaggtggt ctgtataact ttatccatgt 11880
 ctttcttctc agcccatca ctttacaagc cttggttcag tgtggacagc ctcatgctc 11940
 cactcacatc ctccagtggc tgaaacgtgt gcatgccaac ccccttctga tagatgtggt 12000
 cacctacctg gtggccctga tccccgagcc ctccagcacg cagctgcgag agatcttcaa 12060
 catggcgagg gatcagcgca gccgagccac cttgtatgcg ctgagccacg cggtaacaa 12120

gtgagtttcc acaactgtatt tctcctccta ggagcagagg aacatcttgc acctctgtgc 12180.
 atctctgtat taaaactgaa cccctccttc cactttcaaa ctctgctcct tactcttgtg 12240.
 ttttttcttg atcatTTTTg gggtaatgac ttgaaataag aaatcagcaa acacaaattg 12300
 aattttttaa aatattttct ctacattata ttataaaagt ttttgaacat agcaaagttg 12360
 acagaatttc acagggaaaa cccctagaaa accagctatc tcctactatt taagtgttat 12420 .
 tatatttgct ttatcacata tacatccatc cattaattca tcttattttc tgaagcattt 12480
 caaagtaaat tgcaaacatc aacacacttt cccctaagta ttacagcttg catattatta 12540 .
 acttcagttc aatattagtt agcagttttt tcctctgaat ttttttgttt gtttgttttg 12600
 tttttttttg ttgttgttgt ttttttgaga tggctcact gtgtcaccca ggctggagtg 12660
 cagtgatgca gtcacggctc actgaagcct caaatcctg ggctgaagtg atcctccac 12720 .
 ctgagcctcc tgagtagctg ggaccacagg tgcagtctac catgccctgg ctaatttttg 12780
 tattcttggt agatacaggg ttccaccatg ttgctcaggc tagcaggttt ttcctttgat 12840
 gaaatttttt ggctttttct tttttacatt ttatataaaa tttatgtgga acaagtgtaa 12900.
 ttttgttaca tgaatagatt gtgcagtagt taagtcaggg ctctcaggg atccatcacc 12960 .
 cagacaacat atagtgtacc cactaagtaa tttctacca tccatctccc tccacttcca 13020.
 caccttctga gtctcaattg tctatcatc cacacactat gtcttgtgt gcacattatt 13080
 tcactccac ttataaatga caacacgcaa tatttgtctt tctgtgactg tcctgtttca 13140
 cttaagacaa tgacctccag ttccatccat gttgtgcaa atgacatgat tttattcttt 13200.
 ttatggccga atagtatttt attgcctata catttcacat ttttaatcca atcgtccatt 13260
 gatagacact taggttgatt ccatgtcttt gctattgtga atagtgtgt gataaacata 13320 .
 tgggtgcagg ttctcttttg atataatgat ttcttttct ttaggtatat acccagtaat 13380 .
 gggattgttg gatatttttg tagttctatt tttagttctt tgagaaatct ctgtattgtt 13440
 ttccatagtg gttgtactta ttacaaatc catcaacagt gattaactgt ttctttttct 13500
 ctgtatctc accaacaact gttatttttt gtcttttgaa taatggccct cctgactctt 13560
 gtaagatgtt atctcattgt ggttttaatt tacatttctc taatgattag taatgttatg 13620
 cattttttca tatgcctatt gccatttgta tgccttcttt tgaaaaaat gtctattcat 13680.
 gtcctttgcc tactttttta tgggattatt tgggggattt ttttgttgag ttgtttgaat 13740.
 tgcttgtaaa ttccggatat tagtacccca ttggatgaat agtttgcaaa tattttctcc 13800
 cattctgcag gttaccaccc tgttgattat ttgttttact gtgcagaaac tttttacttt 13860
 aattaagttc tatttgtcta ttttttgttt ttgttgcct tgcctttgag gtcttattca 13920
 cgaattcttt gtctaggcca atgtccagag aagttttccc taggttttct tcttgcat 13980
 ttatagtctc aggtcttata ttttaagtct tgatccatct tgagttgatt tttttatatg 14040

gtgacagata ggagtcacgt tttattcttc tgcataatggc aatccatctt tcccagcacc 14100
 acttattgaa aaggggtgtcc tttccctagt gtatgttttt gtcaattttg tcaaagatcc 14160
 gttgactgta agtatgtgac tttattcttg ggttcagtat tctgttccat tgatctatgt 14220
 gtctattttt atgccagtac catgctgttt agattactat agccttggtg tataaatctga 14280
 agtcaggtaa tgtgatgcct ccagctatgt tctttttgct taaaattgct tcagctatcc 14340
 aggctctttt tggattccat atgaatttta taattatttt ttctaattca caagtttggg 14400
 ttttaagaca aacctaactg gggttaccaa gtccctgactc tcttctctta ttctgtagct 14460
 atcataagac aaaccctaca gggaccagg agctgctgga cattgctaata tacctgatgg 14520
 aacagattca agatgactgc actggggatg aagattacac ctatttgatt ctgcgggtaa 14580
 tctcagtcctt ttatatgaca tacatcattt cagaagcact tttcctggac accttttact 14640
 tccctctcct gcaccctgat gggttcttgt ttcttttctt caatgcaggc cattggaaat 14700
 atgggccaac ccatggagca gttaactcca gaactcaagt cttcaatcct gaaatgtgtc 14760
 caaagtacaa agccatcact gatgatccag aaagctgcc aaccaggctct gcggaaaatg 14820
 gagcctaaag acaaggtaaa gtccacaaga agaggtctga aagtgaagat ttattaacaa 14880
 ggatttgtaa ggtactaggg gaatgagact ctagatttca tctactgact ttattctgct 14940
 gtttctttcc tttcttctt tcttctcttc ctctctctc cctctctctc ctttcttctt 15000
 tcttctcttc ctctctctt tcgagatgga atctcactct attgcccagg ctggagtyca 15060
 gtggcatgat ctgggtctac tgcaacttct gcctcctggg ttcaagcaat tctctctgcc 15120
 tcagcctcct gagtaactgg gattacagge atgtgccatt acaccagct aatttttgta 15180
 ttttttagta gagatggagt tttgccatgt tggccaggct ggtcttgagc tctgacctc 15240
 aggtgatccg cctgcctcag ccttgcaaag tgctgggatt acaggcgtga gccactgcac 15300
 ctggcctcta ctgttttcta attgcaaatt tcaacaagcc tattgacttg actgcctagc 15360
 agtatgtgac gtgagagaaa tacttgactt tgctgctatg tcaacatgca gaacgtgaga 15420
 tgtttttgct tctaccgtc cacctaccag attgaccatc cctctcatca tggaaaaaca 15480
 tgcttaattt tcccccaata agcttaggct aggatagcca acttggtccc ctcttaggtg 15540
 caaagactcc agaacttttg aaactacct atttattagc cccaaactct tactacctc 15600
 tctcatcttt atcctcacat taaaataact tacgttaaaa caacttgatt ttcacttagt 15660
 ggtggatctc caaacaatc acaacttggc cataatttat gtgttttaat ggaattgaat 15720
 tcaacaggca ttccacaggc tttttctggg aacccttact tgatagtgtc ctaggaaaca 15780
 ctggcaagaa gattcaatac cagcatitga agaacgatta cagagaaatt agacctgtgc 15840
 ttaagaaaga gctagcagac aatgccagtg ttgcccaggc atgttctgtg ttctgaccac 15900
 aggacagtga taaccatctc ctcttttgac tgcaggacca ggaggttctt cttcagactt 15960

tccttgatga tgcttctccg ggagataagc gactggctgc ctatcttatg ttgatgagga 16020
gtccttcaca ggcagatatt aacaaaattg tccaaattct accatgggaa cagaatgagc 16080
aagtgaagaa ctcttgaggc tcccatattg ccaatatctt gaactcagaa gaattggata 16140
tccaagagta agtaagagct attcacccca tataccactg agggccctga gctggaattc 16200
caaccctagg ttttggcata gccactgtct gcccttgctt ctgaaacaaa cacttgtagc 16260
aatgtgtagc agatctagac ccaagactt agggctcaatg aaatcaagac attttggtag 16320
tgattggaaa tccatattta ctgggggtgc aagagtcaaa ggataataac atgggtgtgtc 16380
agctcaaaat atacttcttc ttatctagtc tgaaaaagtt agtgaaagaa gctctgaaag 16440
aatctcaact tccaactgtc atggacttca gaaaattctc tcggaactat caactctaca 16500
aatctgtttc tcttccatca cttagaccag cctcagccaa aatagaaggg aatcttatat 16560
ttgatccaaa taactacctt cctaaagaaa gcatgctgaa aactaccctc actgcctttg 16620
gatttgcttc agtgacctc atcgaggtaa gtgtgaagag tttgaggttc tctagcccat 16680
ttgttacagc atcataaaca gagagtcctt gggagccagg agtaccagc aggaaaacta 16740
agaaccacca ggcacttctt accatgattc tgaggctttc ttctttccct ccttccccgc 16800
cttctctctt ccccgctagg ggtcacctga agcatgactt cttaacatta atagaaatgc 16860
aggcctggcg aggtggctca ctctgtaat cccagcactt tgggaggccg aggcgggtgg 16920
atcatgaggt caggatatcg acaccatcct ggctaacacg gtgaaagccc atctctacta 16980
aaaatacaaa aaattagccg ggcgtggtgg caggcacctg tagtcccagc tacttgggag 17040
gatgaggcag gagaatggcg tgaaccagg aggtgagct tgcagtgagc cgagagattg 17100
cgccactgcg ctccagcctg ggcgacagag caagactcca tctcaaaaaa aaaaaaaa 17160
aaaaaaattg aaatgcaaat gtctcgtctt taagtcccaa agccaaggaa gcatatgtgc 17220
tgcttagtca gatctgcttc aaatctcaaa tctctcccaa ctctgaatcc tttgttgaat 17280
tatattgtct atctgaacct tagctgcctc ttctagaaaa aagcaagtaa taaggccaag 17340
attctagtga gattttaata aagcagctcc tgtgaaatgc taaggtcagc tctggcctg 17400
tggtattcaa atacttgttt agataaatgg acatcaagag tggggactac taggctggca 17460
tacaacaaag aaacctgatg ccattttctt gtctgatttt ctttctcaga ttggcttgga 17520
aggaaaaggc tttgagccaa cattggaagc tctttttggg aagcaaggat ttttcccaga 17580
cagtgccaac aaagctttgt actgggttaa tggtaagtt cctgatggtg tctctaaggt 17640
cttagtggac cactttggct ataccaaaga tgataaacat gagcaggtgt gtatttgtga 17700
agtatcttct taaggaaagc tttgggtctc aatgcaaaaa caattctttt ctaagcatgg 17760
aagtcctcaa aatactatct aactgaaggg ataactatgg tttttatcaa ccagacctgc 17820
tggggtaagg gccagtatcc tctgcagtta aagatctcct gaattcagtg tgcccagaaa 17880

ccagactcac aataagtact ctaggataac aagagtatga actctgggct ggggtgtgggtg 17940
gttcatgcct gtaatcccag cactttggga ggccaagggtg ggcagatcac aaggtcagga 18000
at ttgagacc agcctggcca acatactgaa accccgtctc tactaaaaat acaaaaaaac 18060
tagctgggca tggtagtggg tgcctgtaat cctagctact cgggagggtg agacaggaga 18120
attgcttgaa cccgggaggt ggaggttgca gtgagccgag atcacgccgt tacactccag 18180
cccgggtgac agtgtgagac tgtatcttaa aaaaaaaaaa agtatgaact ctgggcatag 18240
atttaattct aacttccctg tcttgaagct gtgcgcactt ggggaagttg gttgatatta 18300
tgtgtatctg tttctgtctg tatcccagac tactaataac agtccaaacc tcacaagggtt 18360
atttaaagac aatgaaataa ggcattctaa atgccaaagca cagtgcctga tgctggcatt 18420
ggttgttcaa taagcagaca ctattacgag ttctaaatta atattttcat tattattaac 18480
tgctgtcttt ggctctcact cccatcagtg cactagcaaa tgagaccaa cttccacttt 18540
gaagctagca atgagccccc atttaaggag ggaaataggt tgtatgatct ggagcttatt 18600
cttgaatttt ttgctaccca aagtgtggtc tggtcagaaa tacagcttct catgcttcac 18660
ccacaatcta ctgaatcaga agcgcatttt agcaagacct catgtgactt gtatgcacat 18720
tcaactttgc agagcaaggc agtaatttac ccctccaggc tcaactgttg gcacgagctc 18780
catcttctaa tttctgacc cccacttgag gccgaggatc tttgatctgc tttgagtctg 18840
tcagtttcac attttttttt tcccaatgcc tgggcatcca tctctgagat tcttcttctc 18900
tctgagaaga acttgtctag gatcaagtgt ttttcaaact tctgggtgaat ttatataaca 18960
gctacatttt cttaagaaac accttgtagt ctteactggc caaagaagag aaggctaagc 19020
aggggaacggg tgggggatag aggatcttct aatcttgagg atcctggcat actggagaat 19080
agggaccctt cctctcatcc caccacatct tactatgtct acagattttt taattaagaa 19140
tagctttagg agtgccacta tccctgacaa gacctagtt cttaaatctc tgcttagagg 19200
aattagcctg gacttcagtg tctccctggt cctcacctgg agcatttttt aggcccatcc 19260
tggctgcac agacagggtc cacattggga actgaaaggt gtttgacatt gctgacatct 19320
cactggccat tttattacta aactctcagg atatggtaaa tggaataatg ctgagtgttg 19380
agaagctgat taaagatttg aaatccaaag aagtcccgga agccagagcc tacctccgca 19440
tcttgggaga ggagcttggg tttgccagtc tccatgacct ccagctcctg ggaaagctgc 19500
ttctgatggg tgcccgact ctgcagggga tccccagat ggtaagtcag caggccccac 19560
tggggggcca tgagaccaga cgttggtttt tttttagatc gccagactc ccttacgac 19620
ccagctgcac aagcccgaaa agatgcttgt actttcttca gagatggagg tttgccttga 19680
at ttactga agatgactct tggatcacat ggaaatgtta acatttagaa attaaagctat 19740
tcataatgtt agctgtattt ttaagagcat taatttatcc atctggaaaa caatgttcgg 19800

tataccttcc tctacctttg ctgaagggtcc ttttattttt atttttattt ttttaatttt 19860
 ttgagatgga gtcttgctcc caggctggag tgcagtgata caatctcggc tcactgcaac 19920
 tctgccttcc ggggtcaagc aattctcctg cctcagcctc ccaagtagct gggactgtgg 19980
 acgtgcacca gcatgcccgg ctaattttgt tatcttttagt agagacaagc ctgttgacaa 20040
 ccatgtcagg ctgggttctga actcctgacc tcaagtgatc ctccagcctg ggcctccac 20100
 agtgctggaa taacagggtg gagccactgc acctgacctg aaggctcctt taagattgaa 20160
 atgatacaat gattataaaa gaaagtattt ggcaaactat aattcactat ctaaatatgc 20220
 tataattttt attattaatt cataaaagga aatatataaa tgtactccta tggcttgatt 20280
 aaaaaaatgt tgactttaag aaaacaggtc tcaagctatt ttattgaaat attatttaaa 20340
 aaataaaacc caatgcaaat tgatatgtac atcatctcaa taggcctttg gtttcaaaa 20400
 attgatttta tcataatata atacatttca agtacacctt cacttacagt cagactccag 20460
 aacaccagaa ttaagccatg gcatatatga tacttaaagt ccataaagct ctgaggccca 20520
 gcaatattct taagagcctt ctgagtcac ttgaaaatga catgatctct atctagtga 20580
 atttcttata tcttgattca ctgaaaacgg taaaaacatc agtttgatct ttatttatca 20640
 aactattcag ctcatcaaaa tatgctagtc cttcctttcc agataaagag gaattactct 20700
 ccaatgtatg ggagggtgta attaacaanaa ccgactttaa aaagacttac ttttatttgc 20760
 tctcccttgt tgggtctaca gattggagag gtcacagga agggctcaaa gaatgacttt 20820
 tttcttcaat acatcttcat ggagaatgcc tttgaactcc ccaactggagc tggattacag 20880
 ttgcaaatat cttcatctgg agtcattgct cccggagcca aggctggagt aaaactggaa 20940
 gtagccaacg taagattctg tttgcctttt gatttcttag gttattactt tcttccaggg 21000
 tgcatttctt gttaaaacat atttaaaaat gtgtttccac ttcaagacaa aatgcttcat 21060
 cattgtaate acctcattat ttttttatga aaaacttcaa gcttccacca gaatgactta 21120
 cctcactage tccagtagtg gtatggccat aagacaagaa ctacagttctc tcaacaaatg 21180
 agtatccta tcactttttt aatctggttt tgectcacgt taactcaggt gctttctagt 21240
 tctgggtagt atactccaac tctagagaac tgagaactcg ctttcttct tccaaacaaa 21300
 tcccagtaat gtttccaaag gtctgagtta tccaggaaat ctttgcccgg aggtgagaaa 21360
 ggggtggtga tctgactgac aggggactga agtatttaat gaatctgaat aggttggttt 21420
 ctgacttata gatgcaggct gaactggtgg caaaaccctc cgtgtctgtg gagtttgtga 21480
 caaatatggg catcatcatt ccggacttcg ctaggagtgg ggtccagatg aacaccaact 21540
 tcttccacga gtcgggtctg gaggtcatg ttgccctaaa agctgggaag ctgaagtta 21600
 tcattccttc cccaaagaga ccagtcaagc tgctcagtgg agggtaattc tttcagccaa 21660
 gtctgcctag ccagtttgaa agagagaaca gagaatgtac ctgcagaatt ttgccaggct 21720

aaacagttga ttgagatcat tcaggtcctg aggaagcagg agaggagtag aaaggaaaga 21780
 ttccgggtta cctattttaa ttctagccta gacttactac ataactacat aattaccttt 21840
 cttctacttt tcacatttta ctaaactgtc ctttatcttt ctgctttgag acttattaag 21900
 acctactgct taattagttt ttattaagtt gtgatttttt gttatctatt tgttttgaga 21960
 atgaagaaac aatagctctg gagagatcat ctttggaata ttaatatatt ccccccaaa 22020
 aaatacctaa gaacatattg atttgaggta gctaggtagg taaagcatga aactcctaac 22080
 ctctgataa tggataacag cctcttttgg agagttccat ttttaagtgg accctcaacc 22140
 attgatttgc cttagttttc atattttaga cacattcatg tgttcattca aaaataatat 22200
 ttaattggcc agccacgggt gtcatgcct gtaatcctag cactttggga gcccagggtg 22260
 gatggatcgc ttgagcctg gtgtttggat accagcctgg gcaacatggc aaaaccccat 22320
 ctctacaaaa aaaattaaat aaataacaaa attagccagt cgtggtggca catgcctgta 22380
 gctccagcta ctcaagaagg tgagatggga ggatcaactg agcccaagag ttcaagcctt 22440
 cagtgaacca tgcttgacc actgcactcc agcctgggag acagagcaag atcctgtctc 22500
 acaaaaaaca aaaaatagta tatttaattg cctaataat accacgtatg ttgagtga 22560
 cacacaaggt ccctgacctt tgaacgctta cattttataa gggagacaca caattaagca 22620
 agcagtaatc atagagtaag ggctaagtta tagaaagtat tagagtacca tgaaatttta 22680
 tatcatgtag cctgtgctag tcagggatg cattctgaag caagtgtact tgacctgata 22740
 actgaggact gtgtcagagt catttaggca aaggagaaag gagtgagtgt tccaggcaaa 22800
 aggaaaagca tgtaattggc tgaaggtaaa ggaatatggt tcaaggaaact ggaagaagt 22860
 cagaatggta aggggctcag agatgatggg gagaggtagg caggggagag agcatgccc 22920
 gctgcgaaag ccatacctaag gagtttggac tcttttgaag gcacaggagt tgaaaagggg 22980
 agcagaaata agataggggt gatgttttag aagaaatact ctgactctag tgtggaagat 23040
 ggggtgagaag gaggcacagc tggacacgaa gagaccattg gacatctctt acgatcctat 23100
 gtggctaaga gctgataatg gcctgcagtg gagaaaagcc aggtatagaa aggagtgagc 23160
 agattctaca actttctaag aggcagaatc ataagtactg ggtgattaac tgggtatggg 23220
 gacaaggcaa aagaaagaag aaaagaggaa ggaggcgccc ttcattttaa taagaactac 23280
 agtgggagag cttctggttt caaggaaagt gacaaattca gttttggatg tgctgtattt 23340
 gatgtcctcc tatgaaacaa ccagtttaga aatctagctg tcaaatagac ctatggatct 23400
 gagcccagta aagaggcttg ggctccacat atggatttgg gaatcattag tatacagagg 23460
 ttgttgttgt taaacagcaa ctggtataga gtgagacatg agagatgagg acagaaatat 23520
 ggagaagaca aacatataaa ggaagaaggg gaataaccag caatgagtta gaagaagtga 23580
 ccagagaagc agaaggagaa ccaaagccat aaaaggtcac agaagccaaa gagcagccac 23640
 aggggagatc acccatggg taggcgaaag ctggcattag gactccagca catcagcaaa 23700

gcttgggtctt gtggcaccac caacttggag aaacaataact tggaggaaaa tgtgctatatt 23760
 caaagaaagc atccttagaa aaaaccaggc caatgttgaa ctttcttaca tgtactaagt 23820
 ttttaagtac acacttggaa ggaaggtgcc atcatctctt cagatgtgag aggctccagc 23880
 gtcttagtct ggtcatgagt gcgcaactct atggaaggct tctgggaggt caaggaagat 23940
 gaaacctaata tatgccatt ggatgttaga gcaaggaggg cattagagac attgatgaaa 24000
 gcattttcag gagatggagt gagcagtcag agcacattgg gaggaagtag agactgcaaa 24060
 ggcagacaac tcttgatggt gaggaagatg agaaagcaag aaaagaaaaga aaggagcata 24120
 gggggagggg acaggggaag agacttgagc gtgcttaatg cagggtggaag gaagcaggta 24180
 gagagtagga gatttcatat gaaagagaca gtttctcttg ccctgcattg taggaaggaa 24240
 ggggcacact gaagttcagc ccagtgatc agctatttaa catctctgag cctctgcttc 24300
 tgtaaaatga gaaccataag cctactgttg tggggattac aggtaacaga tggaaagaac 24360
 tcagccagaa gcttcagagt cactctcatg gcttgctcatg ttgatgttct ttctaataatt 24420
 atttgtttct cagtaaatga aatagttaga gatagggtg gactgaggga agacaggagg 24480
 ataagggggt atttgcaccc tgagaatttg tgatgtccat tttgattcat gacttggcaa 24540
 taactcaggt atttttgttc ttcaccagca acacattaca tttggtctct accacaaaaa 24600
 cggaggtgat ccacctctc attgagaaca ggcagtcctg gtcagtttgc aagcaagtct 24660
 ttcttgccct gaattactgc acctcaggcg cttactccaa cgccagctcc acagactccg 24720
 cctctacta tccgtgacc ggggacacca ggttagagat gctcagtgcc tgaccagca 24780
 ttttctcacc ttccacatca tggccaccta gcatggcaca ggaaaaata ctctgtgttg 24840
 taagaccctg tcaactagcct tctgggtttg caccatcttt gggatattaa agcagggtcc 24900
 tctggccaac acattgggtg tcaccttttg cttccttggt catgggatgg gatcacagca 24960
 cagatcccaa tttgctccta attcagtgtc catgtttctg agcctccaga cccatcgcta 25020
 tgagcttcct ggagcccacc aatgtgcttg aagccttcac cgtacttagg tggctccctg 25080
 tcttcagccc ccaagttcca gtgcttggtc tcagctttgc tgaaacaacc agccaactcc 25140
 tgctctgctt gtccaaagtc ttgggaatcc tgggtgtctg ccttgcttg ggttcttgta 25200
 ggactgaggg atcaaaaaga tcatcttagt taagggcaag agacaatgtt aaaataagga 25260
 ccataatatt gttgcatttg aggctgaatt gttttgggaa cataatcacc atccttgaaa 25320
 gctctaacat tatgcactgt cttcattgta atgtctttag attagagctg gaactgaggc 25380
 ctacaggaga gattgagcag tattctgtca gcgcaacctg tgagctccag agagaggaca 25440
 gagccttggt ggataccctg aagtttgtaa ctcaagcaga aggtgagtat tcaaaacaca 25500
 gctgcctcat ctctgctcgc agtctcaggt tcagaattca tgaggagaag acatgtaatt 25560
 taacctatatt aacaaatag ttaactgagt acccactaag cggcaggcct attctaagac 25620

ctgggttaac tgagtaccca ataagcggca ggcctattct aagacctggg gctagaacag 25680
tgaacaatgg agtctctgcc ttcattggaag ttacagtga caaccaaaca agttaatat 25740
tggaatatca gataagtact gaggaggaaa acagagcgta gactgggtcta tggaggggcta 25800
ggagtaggag ggaggaagaa gggcagggaa agcagtgcac ttggaataat aagggaaggt 25860
ctccctggta aagtgagcat aaggagacct atcagaaata agaggagaag ccgtgtggta 25920
agactgttaa caggcagagg gaccagcaag tgcaaaggcc ctgaggctga cactacta 25980
ccatgtttca aggaaggaa ggaagacagt atggctggag cagaaagacc agggagaaaa 26040
gaggtagaag atgaggacag agagatatgg agaggtgaag gaaggataat ctcattaggcc 26100
atggtaaaga ctttggcttt ttctatgaat taaacgaaag ccattgggga gtcctcatga 26160
tttgatttat gtttatgttg agaaaagact atgggcagac aagggcagag aaactaatat 26220
gtaggttatc acaataatcc aggcaggaat cagtgttgtt ttggatcagg gcaatggcag 26280
aagagatatg agaaggggat ggattctggc catattttga agattaggct gacaagattt 26340
gctgatacag tggatgttga gtgtaagagg aaaaggggaa tgaagacaaa cctaaggttt 26400
ttggcccgga caactgaaa atggaacttc catttattga gatggaaagg gctactggag 26460
gagcaggttt tagggaatgg gagaaattta ggtgttcact ttggaaaaaa aattatatag 26520
ggatagcgag gagcaggttt tagggaatgg ggcacattta ggtgttcact ttggaaaaat 26580
tttatatatg ggatagcata tcacagaatt aaactaggaa gaaaatccca tgatagaag 26640
cactggagga gcagggcacg ctggggaaat agtgttttgt aaacattgtt ttacgaagga 26700
tataaatgg accagcctat ggattgaagg acgcccggga atcttgttac aaagaaagg 26760
ggagttgggg agatggagcc cagggaagg gcagcaagga accaggacag gcattctggg 26820
tagaaagtaa tatagagatg tcgtgtcttc ctggcccgaa agggctgcga gcctttgctg 26880
ttccacaaac aagctaagt ctccccattt cagggccttt gcattcctga ccttctgct 26940
ggaatgtgct cctcccgaa ctcagcgtgg ctccaacctc ttttcattct ggtctctgcc 27000
cacatgtgcc cttatcagag agaatttctc tgaccaccaa gtatgaaata acacttcttc 27060
tatcccttcc ttttatcctt gtatccagtt ttactcttct tcataacatt cattaccatc 27120
tgacatgagc aagttacttg ttatttgctt gtacacctcc cccactagaa ggtaagcccc 27180
atgaaagcaa ggattcccca gtaccaagag cagtgccag cacacaatag gctcataaca 27240
ggcaatccat aaagacttgc atacatgaac acaactgagt ttaaaattat cagtaaatga 27300
gacccattaa aaaattttta tgagaaaaaa aaaattcagt aaaatcctga actgtgtttt 27360
tgtttaagca cattgattcc ttggagtctc tctacctttt cctctctttc cttccaaaac 27420
atagcttctt tatttattta ttattttatt tgtttgttta ttattttatt tatttattta 27480
tttatttttt gagatggagt ctgcgtcttt tgcccaggct gcagtgcagt ggtgccatct 27540

cggtcactg caagccccgc ctcccggtt catgccattc tcctgcctca gcctcctgag 27600
 tagctgggac tacaggcacc caccaacgcg cccggctaatt tttttgtatt tttagtagag 27660
 acgggggtttc accatgttag ccagaatggt cttgatctcc tgacctcatg atctgccccg 27720
 cttggcctcc caaagtgctg ggattacagg tgtgagccac cgcacccggc caaaaacata 27780
 gcttcttacc acacatctct tgattctctt atacactcgt ccagggtgca agcagactga 27840
 ggctaccatg acattcaaat ataatcggca gagtatgacc ttgtccagtg aagtccaaat 27900
 tccggatttt gatgttgacc tcggaacaat cctcagagtt aatgatgaat ctactgaggg 27960
 caaacgtct tacagactca ccctggacat tcagaacaag aaaattactg aggtcgccct 28020
 catgggccac ctaaggtaaa gaaggccgag ggtcatctga cctgcactgc aggcctgggt 28080
 ggttcttttc attattcctc ttccacttca tacctgacca agccatgttc tcccctagtc 28140
 tacaatcaga gtggcagaga gagccctcaa caatTTTTTT tttttttgag atggagtctc 28200
 actctgtcac caggctggag tgcagtggca caatctcggc tctactgcaac ctccgcctcc 28260
 cgagttcaag tgattctcct gcttaagcct cccaaggagc tggaactata ggtgcatgcc 28320
 accacaccca gctaattttt atatttttag tagagacagg gtttcacat attgaccagg 28380
 atggtctcga tctcctgacc tcgtgatcca cctgccttgg cctcccaaag tgctgggatt 28440
 acagggttaa gccactgcac ccggccaagc tctcaacatt ttaaccctct gcgcatgtcc 28500
 agttggattt tcctaccatt tatcaggcac ttactattca tgtatcaagc acagtgtctg 28560
 gtgctttaaa gaaattatct cggtcctcac aataaactgc gaggtcactg tgagttttcc 28620
 tgtttcatgg ataaggaaat ggtagctcag aggggttaaa tcatttggtc aaaatcacag 28680
 agctagtaaa tagcagagca ggattcaaac agttttcaaa aaacttctct ttctcctaaa 28740
 cctgtttgca aagtcotaa tttgtgctga atgttggtt tagaagttga tgagtttgat 28800
 ctgtggctgt ttctctgaac catccttgta tctggttttg atcaccacaa atggaacttc 28860
 tgtttaatcc tgcatactc cattgaaagg acaaatcat tggtgccaa tgattttctt 28920
 taccatagtt gtgacacaaa ggaagaaaga aaaatcaagg gtgttatttc cataccccgt 28980
 ttgcaagcag aagccagaag tgagatcctc gccactgggt cgctgccaa actgcttctc 29040
 caaatggact catctgtac agcttatggc tccacagttt ccaagagggt ggcatggcat 29100
 tatggtatgt gtctcttccc ctgtgtgagc acttccaaag taatgcagggt gttgagacct 29160
 gtggttacag gctgaactag taccattcac aactatttcc tacgtatttt cagatgaaga 29220
 gaagattgaa tttgaatgga acacaggcac caatgtagat accaaaaaaa tgacttccaa 29280
 tttccctgtg gatctctccg attatcctaa gagcttgcat atgtatgcta atagactcct 29340
 ggatcacaga gtccctcaaa cagacatgac tttccggcac gtgggttcca aattaatagt 29400
 tgtaagtatg agtctgccag tcaataaata catggatata agtgctaatt acatcctcaa 29460

ctctgagcta ggtgcaggaa gggtttccaaa gatgtataag gcatgcttcc ttccccccag 29520
 ggaattcttg gggagaaaaa aaaactttca caagtgtgta gttacccagt tacacaaagc 29580
 tgaatgtgat acatatcaaa gagatgctac taagtagaac agttctttgc ctagtgggat 29640
 caaaggaagc ttcaggacac cagctaggag gctgactatg tlagacattc cttttataaa 29700
 tatggacagt gatcagtgc tggcaacgaa gattcataat tttctgttat ttatttttaa 29760
 ctttcagtgc attgtccagc ttaataatta acttgtcaaa tcgggtatttt tgcctaattgt 29820
 tcattgctct ttgaggctca tocaagocca ttaccttaaa aatctcctgt cattttgtag 29880
 gcaatgagct catggcttca gaaggcatct gggagtcttc cttataccca gactttgcaa 29940
 gaccacctca atagcctgaa ggagttcaac ctccagaaca tgggattgcc agacttcac 30000
 atcccagaaa acctcttctt aaaaaggtaa aagaagaaag cagcaaggct tcttgaacca 30060
 tgcaaagtaa atgaaagatt ttacatagca tgatttagac atttttttaa atttttaag 30120
 gaaataattt aagcatttta aggagattaa taactatagc acaaactg tggcatctt 30180
 gcattagtaa acatgagaac accaaccctg tcaggaagaa tctaagaaag tcattagagg 30240
 attctggtag tttcacccta agatatatta ttcagtacaa cctgttataa gcaaattctc 30300
 cctctgactg tgaagaattc agaatggcta gaggcgttat tgactacagg cttgctgtta 30360
 agctagagag agtcagaaca gccattgagc actaaatgga ggcagcattc tgagaaaata 30420
 ctttaaccca ggcttactga cttccatacc tatgttcttt ccacaaatca agttgtctca 30480
 attcagttta gcaaatgtgt atcaagtatc ccctatgtgc aaaatgctag actaggtaca 30540
 gtgagaagat agaaactggg taaggatatag ccttttcttt caagaagata ccatggagac 30600
 atcaacaaat gagaaataat taattatata agcaaaatta tgacatgctc tttgagaaag 30660
 gtqcaagggg ctatgtaact gtaagaatga gacaaattgg ctatgactta ggtgggatgg 30720
 taatgataag gagtggccct tagaagagct ttgtcaggat ttgagtgttt gacaggtgga 30780
 ggtaaaagca aaggggtcca ggcataggag tagcacaaag aaaagtgcag agtggctttg 30840
 ggaatggggc aagtacaata ttgttgtgaa ggtcagaggc agagaacttt gaatgactga 30900
 tgtctgactg tggggatgtt atctttgttg ttcatttcag cgatggccgg gtcaaatata 30960
 ccttgaacaa gaacagtttg aaaattgaga ttcctttgcc ttttgggtggc aaatcctcca 31020
 gagatctaaa gatgttagag actgttagga caccagccct ccacttcaag tctgtgggat 31080
 tccatctgcc atctcgagag ttccaagtcc ctacttttac cattcccaag ttgtatcaac 31140
 tgcaagtgcc tctcctgggt gttctagacc tctccacgaa tgtctacagc aacttgtaca 31200
 actggtcgc ctctacagt ggtggcaaca ccagcacaga ccatttcagc cttcgggctc 31260
 gttaccacat gaaggctgac tctgtggttg acctgctttc ctacaatgtg caaggtgagc 31320
 tatgtctagg taaagggtgc accgggctag ttcattggcag gctctaagag gagagcctcc 31380

tccagggagg aaaggacttt ggcttttctag cagataatct tccttgctac ttggaagtct 31440
 tttattttat tcaacaaata gaaatattta ttaaacadat cacgtgtatt aaatattcta 31500
 gtaggcagta acagaaagta gacagataag ccagcaatta taattcagtg tgagaggtgc 31560
 tatgataaag ttagtatatat aagtataagg tagagtggaa gcactcaaca agggaacctt 31620
 aacaaagcct gtggtggtca ggcaaggctt cctggaggaa tgccttttgc tatcagattt 31680
 tatctttgca ttacagatgg aggagtctat tgcacaattg gccagaaaa atggggcttt 31740
 attattgaaa gactttcaac atagagattg ctctggaaat gtactgctta atttaacca 31800
 tgtcttttca tttttatggt aggatctgga gaaacaacat atgaccacaa gaatacgttc 31860
 acactatcat atgatgggtc tctacgccac aaatttctag attcgaatat caaattcagt 31920
 catgtagaaa aacttggaag caaccagtc tcaaaagggt tactaatatt cgatgcatct 31980
 agttcctggg gaccacagat gtctgcttca gttcatgttg actccaaaa gaaacagcat 32040
 ttgtttgtca aagaagtcaa gattgatggg cagttcagag tctcttcgtt ctatgctaaa 32100
 ggcacatatg gcctgtcttg tcagagggat cctaacactg gccgggtcaa tggagagtcc 32160
 aacctgaggt ttaactcttc ctacctcaa ggcaccaacc agataacagg aagatatgaa 32220
 gatggaaccc tctccctcac ctccacctct gatctgcaaa gtggcatcat taaaaatact 32280
 gcttccctaa agtatgagaa ctacgagctg actttaaaat ctgacaccaa tgggaagtat 32340
 aagaactttg ccacttctaa caagatggat atgaccttct ctaagcaaaa tgcactgctg 32400
 cgttctgaat atcaggctga ttacgagtca ttgagggtct tcagcctgct ttctggatca 32460
 ctaaattccc atgggtcttg gttaaagtct gacatcttag gcactgacaa aattaatagt 32520
 ggtgctcaca aggcgacact aaggattggc caagatggaa tatctaccag tgcaacgacc 32580
 aacttgaagt gtagtctcct ggtgctggag aatgagctga atgcagagct tggcctctct 32640
 ggggcatcta tgaattaac aacaaatggc cgcttcaggg aacacaatgc aaaattcagt 32700
 ctggatggga agccgcctt cacagagcta tcaactggga gtgcttatca ggccatgatt 32760
 ctgggtgtcg acagcaaaaa cattttcaac ttcaagggtca gtcaagaagg acttaagctc 32820
 tcaaatgaca tgatgggtct atatgctgaa atgaaatttg accacacaaa cagtctgaac 32880
 attgcaggct tatcaactga cttctcttca aaacttgaca acatttacag ctctgacaag 32940
 ttttataagc aaactgttaa ttacagcta cagccctatt ctctggtaac tactttaaac 33000
 agtgacctga aatacaatgc tctggatctc accaacaatg ggaaactacg gctagaaccc 33060
 ctgaagctgc atgtggctgg taacctaaaa ggagcctacc aaaataatga aataaacac 33120
 atctatgcca tctcttctgc tgccttatca gcaagctata aagcagacac tgttgctaag 33180
 gttcaggggtg tggagttag ccatcggtc aacacagaca tcgctgggct ggcttcagcc 33240
 attgacatga gcacaaacta taattcagac tcactgcatt tcagcaatgt ctccgttct 33300

ES 2 420 914 T3

gtaatggccc cgtttaccat gaccatcgat gcacatacaa atggcaatgg gaaactcgct 33360
 ctctggggag aacatactgg gcagctgtat agcaaattcc tgttgaaagc agaacctctg 33420
 gcatttactt tctctcatga ttacaaaggc tccacaagtc atcatctcgt gtctaggaaa 33480
 agcatcagtg cagctcttga acacaaagtc agtgccctgc ttactccagc tgagcagaca 33540
 ggcacctgga aactcaagac ccaatttaac aacaatgaat acagccagga cttggatgct 33600
 tacaacacta aagataaaat tggcgtggag cttactggac gaactctggc tgacctaaact 33660
 ctactagact cccaattaa agtgccactt ttactcagtg agcccatcaa tatcattgat 33720
 gcttttagaga tgagagatgc cgttgagaag cccaagaat ttacaattgt tgcttttgta 33780
 aagtatgata aaaaccaaga tgttactcc attaacctcc ctttttttga gaccttgcaa 33840
 gaatattttg agaggaatcg acaaacatt atagtgtac tggaaaacgt acagagaaac 33900
 ctgaagcaca tcaatattga tcaatttgta agaaaataca gagcagccct gggaaaactc 33960
 ccacagcaag ctaatgatta tctgaattca ttcaattggg agagacaagt ttcacatgcc 34020
 aaggagaaac tgactgctct caaaaaaag tatagaatta cagaaaatga tatacaaatt 34080
 gcattagatg atgccaaaat caactttaat gaaaactat ctcaactgca gacatatatg 34140
 atacaatttg atcagtatat taaagatagt tatgatttac atgatttgaa aatagctatt 34200
 gctaattaa ttgatgaaat cattgaaaa ttaaaaagtc ttgatgagca ctatcatatc 34260
 cgtgtaaatt tagtaaaaac aatccatgat ctacatttgt ttattgaaaa tattgatttt 34320
 aacaaaagtg gaagtagtac tgcactctgg attcaaaatg tggatactaa gtaccaaactc 34380
 agaatccaga tacaagaaaa actgcagcag cttagagac acatacagaa tatagacatc 34440
 cagcacctag ctggaaagtt aaaacaacac attgaggcta ttgatgttag agtgctttta 34500
 gatcaattgg gaactacaat ttcatltgaa agaataaatg acattcttga gcatgtcaaa 34560
 cactttgtta taaatcttat tggggatttt gaagtagctg agaaaatcaa tgccttcaga 34620
 gccaaagtcc atgagttaat cgagaggtat gaagtagacc acaaatcca ggttttaatg 34680
 gataaattag tagagttggc ccaccaatac aagttgaagg agactattca gaagctaagc 34740
 aatgtcctac aacaagttaa gataaaagat tactttgaga aattggttgg atttattgat 34800
 gatgctgtca agaagcttaa tgaattatct tttaaaacat tcattgaaga tgtaacaaa 34860
 ttccttgaca tgttgataaa gaaattaaag tcatttgatt accaccagtt tgtagatgaa 34920
 accaatgaca aaatccgtga ggtgactcag agactcaatg gtgaaattca ggctctggaa 34980
 ctaccacaaa aagctgaagc attaaaactg tttttagagg aaaccaaggc cacagttgca 35040
 gtgtatctgg aaagcctaca ggacaccaa ataaccttaa tcatcaattg gttacaggag 35100
 gctttaagtt cagcatcttt ggctcacatg aaggccaaat tccgagagac cctagaagat 35160
 acacgagacc gaatgtatca aatggacatt cagcaggaac ttcaacgata cctgtctctg 35220
 gtaggccagg tttatagcac actgtcacc tacatttctg attggtggac tcttgctgct 35280

aagaacctta ctgactttgc agagcaatat tctatccaag attgggctaa acgtatgaaa 35340
gcattggtag agcaaggggt cactgttcct gaaatcaaga ccatccttgg gaccatgcct 35400
gcctttgaag tcagtcctca ggctcttcag aaagctacct tcagacacc tgattttata 35460
gtccccctaa cagatttgag gattccatca gttcagataa acttcaaaga cttaaaaaat 35520
ataaaaaatcc catccaggtt ttccacacca gaattttacca tccctaacac cttccacatt 35580
ccttccttta caattgactt tgtagaaatg aaagtaaaga tcatcagaac cattgaccag 35640
atgctgaaca gtgagctgca gtggcccggt ccagatatat atctcaggga tctgaagggtg 35700
gaggacattc ctctagcgag aatcaccctg ccagacttcc gtttaccaga aatcgcaatt 35760
ccagaattca taatcccaac tctcaacctt aatgattttc aagttcctga ccttcacata 35820
ccagaattcc agcttcccca catctcacac acaattgaag tacctacttt tggcaagcta 35880
tacagtattc tgaatatcca atctcctctt ttacatttag atgcaaatgc tgacataggg 35940
aatggaacca cctcagcaaa cgaagcaggt atcgagctt ccatcactgc caaaggagag 36000
tccaaattag aagttctcaa ttttgatttt caagcaaatg cacaactctc aaaccctaag 36060
attaatccgc tggctctgaa ggagtcagtg aagttctcca gcaagtacct gagaacggag 36120
catgggagtg aaatgctgtt ttttgaaat gctattgagg gaaaatcaaa cacagtggca 36180
agtttacaca cagaaaaaaa tacactggag cttagtaatg gagtgattgt caagataaac 36240
aatcagctta cctgggatag caacactaaa tacttcaca aattgaacat ccccaactg 36300
gacttctcta gtcaggctga cctgcgcaac gagatcaaga cactgttgaa agctggccac 36360
atagcatgga cttcttcttg aaaagggta tggaaatggg cctgccccag attctcagat 36420
gaggaacac atgaatcaca aattagtttc accatagaag gaccctcac ttcttttga 36480
ctgtccaata agatcaatag caaacaccta agagtaaacc aaaacttggg ttatgaatct 36540
ggctccctca acttttctaa acttgaaatt caatcacaag tcgattccca gcatgtgggc 36600
cacagtgttc taactgctaa aggcattggc ctgtttggag aagggaaggc agagtttact 36660
gggaggcatg atgctcattt aaatggaaag gttattggaa ctttgaaaaa ttctcttttc 36720
ttttcagccc agccatttga gatcacggca tccacaaaca atgaaggga tttgaaagtt 36780
cgttttccat taaggttaac agggaagata gacttcctga ataactatgc actgtttctg 36840
agtcccagtg cccagcaagc aagttggcaa gtaagtgcta ggttcaatca gtataagta 36900
aaccaaaatt tctctgctgg aaacaacgag aacattatgg aggcccatgt aggaataaat 36960
ggagaagcaa atctggattt cttaaacatt cctttaacaa ttcctgaaat gcgtctacct 37020
tacacaataa tcacaactcc tccactgaaa gatttctctc tatgggaaaa aacaggcttg 37080
aaggaattct tgaaaacgac aaagcaatca tttgatttaa gtgtaaaagc tcagtataag 37140
aaaaacaaac acaggcattc catcacaat cctttggctg tgctttgtga gtttatcagt 37200

cagagcatca .aatcctttga caggcatttt gaaaaaaca gaaacaatgc attagatttt 37260
 gtcaccaaatt cctataatga aacaaaaatt aagtttgata agtacaaagc tgaaaaatct 37320
 cacgacgagc tccccaggac ctttcaaatt cctggataca ctgttccagt tgtcaatggt 37380
 gaagtgtctc cattcaccat agagatgtcg gcattcggct atgtgttccc aaaagcagtc 37440
 agcatgccta gtttctccat cctaggttct gacgtccgtg tgccttcata cacattaatc 37500
 ctgccatcat tagagctgcc agtccttcat gtccctagaa atctcaagct ttctcttcca 37560
 gatttcaagg aattgtgtac cataagccat atttttattc ctgccatggg caatattacc 37620
 tatgatttct cttttaaatt aagtgtcatc aactgaata ccaatgctga actttttaac 37680
 cagtcagata ttgttgctca tctcctttct tcatcttcat ctgtcattga tgcactgcag 37740
 tacaaattag agggcaccac aagattgaca agaaaaaggg gattgaagtt agccacagct 37800
 ctgtctctga gcaacaaatt tgtggagggt agtcataaca gtactgtgag ctttaaccacg 37860
 aaaaatatgg aagtgtcagt ggcaacaacc acaaaagccc aaattccaat ttgagaatg 37920
 aatttcaagc aagaacttaa tggaaatacc aagtcaaac ctactgtctc ttctccatg 37980
 gaatttaagt atgatttcaa ttcttcaatg ctgtactcta ccgctaaagg agcagttgac 38040
 cacaagctta gcttgaaag cctcacctct tacttttcca ttgagtcac taccaaagga 38100
 gatgtcaagg gtctgggtct ttctcgggaa tattcaggaa ctattgctag tgaggccaac 38160
 acttacttga attccaagag cacacgtct tcaagtgaagc tgcagggcac ttccaaaatt 38220
 gatgatattc ggaaacctga agtaaaagaa aattttgctg gagaagccac actccaacgc 38280
 atatatccc tctgggagca cagtacgaaa aaccacttac agctagaggg cctctttttc 38340
 accaacggag aacatacaag caaagccacc ctggaactct ctccatggca aatgtcagct 38400
 cttgttcagg tccatgcaag tcagcccagt tcttccatg atttccctga ccttggccag 38460
 gaagtggccc tgaatgctaa cactaagaac cagaagatca gatggaaaaa tgaagtccgg 38520
 attcattctg ggtctttcca gagccaggtc gagctttcca atgaccaaga aaaggcacac 38580
 cttgacattg caggatcctt agaaggacac ctaagggtcc tcaaaaatat catcctacca 38640
 gtctatgaca agagcttatg ggatttccta aagctggatg taaccaccag cattggtagg 38700
 agacagcatc ttctgttttc aactgccttt gtgtacacca aaaaccccaa tggctattca 38760
 ttctccatcc ctgtaaaagt tttggctgat aaattcatta ttctgggct gaaactaaat 38820
 gatctaaatt cagttcttgt catgcctacg ttccatgtcc catttacaga tcttcagggt 38880
 ccatcgtgca aacttgactt cagagaaata caaatctata agaagctgag aacttcatca 38940
 tttgccctca acctaccaac actcccagag gtaaaattcc ctgaagtga tgtgttaaca 39000
 aaatattctc aaccagaaga ctcttgatt ccttttttg agataaccgt gcctgaatct 39060
 cagttaactg tgtcccagtt cacgttcca aaaagtgttt cagatggcat tgctgctttg 39120

gatctaaatg .cagtagccaa caagatcgca gactttgagt tgcccacat catcgtgcct 39180
gagcagacca ttgagattcc ctccattaag ttctctgtac ctgctggaat tgtcattcct 39240
tcctttcaag .cactgactgc acgctttgag gtagactctc ccgtgtataa tgccacttgg 39300
agtgccagtt tgaaaaacaa agcagattat gttgaaacag tcctggattc cacatgcagc 39360
tcaaccgtac agttcctaga atatgaacta aatggtaaga aatatcctgc ctctctcct 39420
agatactgta ttttttcaat gagagttagt agtaaataat tatgtattta gttgtgagta 39480
gatgtacaat tactcaatgt cacaaaattt taagtaagaa aagagatata tgtataccct 39540
acacgtaaaa accaaactgt agaaaaacta gtgtcattca agacaaacag ctttaaagaa 39600
aatggatttt .tctgtaatta ttttaggact aacaatgtct ttttaactatt ttttttaaaa 39660
taagtgtgag .ctgtacattg catattttta acacaagtga aatatctggt taggatagaa 39720
ttctcccagt .tttcacaatg aaaacatcaa cgtcctactg ttatgaatct aataaaatac 39780
aaaatctctc ctatacagtt ttgggaacac acaaaatcga agatggtacg ttagcctcta 39840
agactaaagg .aacatttgca caccgtgact tcagtgcaga atatgaagaa gatggcaaat 39900
atgaaggact .tcagtatgga gcttttattg aattgaaacc ttataccttt tgaaaaacta 39960
ttgtgatatt cttcatctcc atacccttt cgtgatagct catctgtttt tctgctttca 40020
gggaatggga agggaaagcg cacctcaata tcaaaagccc agcgttcacc gatctccatc 40080
tgcgctacca .gaaagacaag aaaggcatct ccacctcagc agcctcccca gccgtaggca 40140
ccgtgggcat ggatatggat gaagatgacg actttttctaa atggaacttc tactacagcc 40200
ctcaggtaaa .taccacctaa tgagtgcac gcccccaaga gcgagtggag aattggggca 40260
gatacattta attcaggacc aaatattcag agattcccca aactagggtga aagacaggcg 40320
gtaagcaact .tcttctctga ggaaatattc tctagaaagt attacaatga gtccttgatt 40380
gattttaatg .tttagatgca cacatgacat ccatcagca ctattattta ttaattctgg 40440
gcaaatccag gaagatgagg gttatacctc atcatctaaa tcataggcaa gtcagccat 40500
aggcagggt .tatttttcag agaggactgg tttctgtagt atttaaaact ttaaaattct 40560
tccccacaat agaattgcta gatgagatac atcaaattcc tctcatgtca tttacaagct 40620
ctgccagggc .caaatcaagg gtgacattac cagaggagaa gaccaaacat ggttctatga 40680
ctgttactaa .aagtttgca tgggcttggga gaatgcgtac tgatgttggg attctgggtc 40740
tctgcagggt .gggctccaac ttgccttttt tgctatttct tcttttccta tctgtcattt 40800
cctgactott .cttctctctc ctcttcttct tcttcccccc actcctcttc cagttttcag 40860
tcctaggaag .gctttaattt taagtgtcac aatgtaaatg acaaacagca agcgtttttg 40920
ttaaatcctt .tctggggcat gtgataaaga gaaattaaca acagtagact tatttaacca 40980
taaaacaaac .acatgaactg acatatgaaa gataaatccc tttcagtata tgaaagattc 41040

tctgatcttt atttttaact gctaatagaag ttttagtgta ctatattgtg taattggagt 41100
aattgaaaac atgttatttt tttttttctc tctgttttagt cctctccaga taaaaaactc 41160
accatattca aaactgagtt gagggtcagg gaatctgatg aggaaactca gatcaaagtt 41220
aattgggaag aagaggcagc ttctggcttg ctaacctctc tgaaagacaa cgtgcccaag 41280
gccacagggg tcctttatga ttatgtcaac aagtaccact gggaacacac agggctcacc 41340
ctgagagaag tgtcttcaaa gctgagaaga aatctgcaga acaatgctga gtgggtttat 41400
caaggggcca ttaggcaaatt tgatgatatc gacgtgaggt tccagaaagc agccagtggc 41460
accactggga cctaccaaga gtggaaggac aaggcccaga atctgtacca ggaactgttg 41520
actcaggaag gccaagccag tttccagga ctcaaggata acgtgtttga tggcttggtg 41580
cgagttactc aagaattcca tatgaaagtc aagcatctga ttgactcact cattgatttt 41640
ctgaacttcc ccagattcca gtttccgggg aaacctggga tatacactag ggaggaaactt 41700
tgcactatgt tcataaggga ggtagggacg gtactgtccc aggtatattc gaaagtccat 41760
aatggttcag aaatactggt ttctatttc caagacctag tgattacact tcctttcgag 41820
ttaaggaaac ataaactaat agatgtaatc tcatgtata gggaactgtt gaaagattta 41880
tcaaaagaag cccaagaggt atttaagcc attcagtcctc tcaagaccac agaggtgcta 41940
cgtaatcttc aggacctttt acaattcatt ttccaactaa tagaagataa cattaaacag 42000
ctgaaagaga tgaaatttac ttatcttatt aattatatcc aagatgagat caacacaatc 42060
ttcagtgatt atatcccata tgtttttaaa ttgttgaaag aaaacctatg ccttaattct 42120
cataagttca atgaatttat tcaaaacgag cttcaggaag cttctcaaga gttacagcag 42180
atccatcaat acattatggc ccttcgtgaa gaatattttg atccaagtat agttggctgg 42240
acagtgaat attatgaact tgaagaaaag atagtcagtc tgatcaagaa cctgttagtt 42300
gctcttaagg acttccattc tgaatatatt gtcagtgcct ctaactttac ttcccaactc 42360
tcaagtcaag ttgagcaatt tctgcacaga aatattcagg aatatcttag catccttacc 42420
gatccagatg gaaaaggga agagaagatt gcagagcttt ctgccactgc tcaggaaata 42480
attaaaagcc aggccattgc gacgaagaaa ataattttctg attaccacca gcagtttaga 42540
tataaactgc aagatttttc agaccaactc tctgattact atgaaaaatt tattgctgaa 42600
tccaaaagat tgattgacct gtccattcaa aactaccaca ctttctgat atacatcacg 42660
gagttactga aaaagctgca atcaaccaca gtcatgaacc cctacatgaa gcttgctcca 42720
ggagaactta ctatcatcct ctaattttttt aaaagaaatc ttcatttatt cttcttttcc 42780
aattgaactt tcacatagca cagaaaaaat tcaaaactgcc tatattgata aaaccatata 42840
gtgagccagc cttgcagtag gcagtagact ataagcagaa gcacatatga actggacctg 42900
caccaaagct ggcaccaggg ctcggaaggt ctctgaactc agaaggatgg cattttttgc 42960

ES 2 420 914 T3

aagttaaaga aaatcaggat ctgagttatt ttgctaaact tgggggagga ggaacaaata 43020
aatggagtct ttattgtgta tcataccact gaatgtggct cttttgtatt gaaagacagt 43080
gaaacgaggg cattgataaa atgttctggc acagcaaaac ctctagaaca catagtgtga 43140
ttaaagtaac agaataaaaa tggaaaagga gaaattatgg agggaaatat ttgcaaaaa 43200
tatttaaaaa gatgaggtaa ttgtgttttt ataattaaat attttataat taaaatattt 43260
ataattaaaa tatttataat taaatatttt ataattaaaa tatttataat taaatatttt 43320
ataattaaag tatttataat taaatatttt ataattaaaa tatttataat taaatatttt 43380
ataattaaaa tatttataat taaatatttt ataattaaaa tatttataat taaatatttt 43440
ataat 43445

<210> 335

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido antisentido

10

<400> 335

tctgtaagac aggagaaaga 20

15

<210> 336

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> oligonucleótido antisentido

<400> 336

25

atttcctctt ctgtaagaca 20

<210> 337

<211> 20

<212> ADN

30

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> oligonucleótido antisentido

35

<400> 337

gatgccttac ttgacagac 20

<210> 338

40

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

45

<223> oligonucleótido antisentido

<400> 338

agaaatagct ctccaagga 20

50

<210> 339

<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 339

 gtcgcatctt ctaacgtggg 20
 10
 <210> 340
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 340
 20
 tcctccatac cttgcagttg 20

 <210> 341
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 341

 tggctcatgt ctacatatt 20
 35
 <210> 342
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 342
 45
 cagttgaaat gcagctaatg 20

 <210> 343
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 343

 tgcagactag gagtgaaagt 20
 60
 <210> 344
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 344
aggaggatgt cctttattg 20

5 <210> 345
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 345

15 atcagagcac caaagggaat 20

<210> 346
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 346

ccagctcaac ctgagaattc 20

<210> 347
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 347

40 catgacttac ctggacatg 20

<210> 348
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 348

50 cctcagcgga cacacacaca 20

<210> 349
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 349

gtcacatccg tgcctggtgc 20

65 <210> 350
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 350

 cagtgccctct gggacccac 20
 10
 <210> 351
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 351
 20
 agctgcagtg gccgatcagc 20

 <210> 352
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 352

 gacctcccca gccacgtgga 20
 35
 <210> 353
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 353
 45 tctgatcacc atacattaca 20

 <210> 354
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 354

 atttcccact gggactctc 20
 60
 <210> 355
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 355
 ggctgaagcc catgctgact 20
 5 <210> 356
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 356
 15 gttggacagt cattctttg 20
 <210> 357
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 357
 cactgttgg acagtcattc 20
 <210> 358
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 358
 attttaaatt acagtagata 20
 40 <210> 359
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 359
 50 ctgttctcca cccatatcag 20
 <210> 360
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 60 <400> 360
 gagctcatac ctgtcccaga 20
 65 <210> 361
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 361

 ttcaagggcc actgctatca 20
 10
 <210> 362
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 362
 20
 ccagtatttc acgccaatcc 20

 <210> 363
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 363

 ggcaggagga acctcgggca 20
 35
 <210> 364
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 364
 45
 ttttaaaatt agacccaacc 20

 <210> 365
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 365

 tgactgtttt aaaattagac 20
 60
 <210> 366
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 366
cccagcaaac acaggtgaag 20

5 <210> 367
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 367

15 gagtgtgggc ttgctagtc 20

<210> 368
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 368

ctatgcagag tgtggtcttg 20

<210> 369
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 369

40 agaagatgca accacatgta 20

<210> 370
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 370

50 acacggtatc ctatggagga 20

<210> 371
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 371

tgggacttac catgccttg 20

65 <210> 372
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 372

 10 ggtttgctg ccctacatcc 20

 <210> 373
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 373
 20
 acaaggagtc cttgtcaga 20

 <210> 374
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 374

 atgttcactg agacaggctg 20
 35
 <210> 375
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 375
 45
 gaaggtccat ggttcactg 20

 <210> 376
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 376

 attagactgg aagcatcctg 20
 60
 <210> 377
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 377

gagattggag acgagcattt 20

5 <210> 378
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 378

15 catgacctac ttgtaggaga 20

 <210> 379
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 379

 tggatttga tacacaagtt 20

 <210> 380
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

35 <400> 380

 actcaatata tattcattga 20

40 <210> 381
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 381

50 caaggaagca caccatgtca 20

 <210> 382
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 382

 atacttattc ctggtaacca 20

65 <210> 383
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 383

 ggtagccaga acaccagtgt 20
 10
 <210> 384
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 384
 20
 actagaggta gccagaacac 20

 <210> 385
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 385

 accacctgac atcacaggtt 20
 35
 <210> 386
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 386
 45 tactgtgacc tatgccagga 20

 <210> 387
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 387

 ggaggtgcta ctgttgacat 20
 60
 <210> 388
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 388
tccagacttg tctgagtcta 20

5 <210> 389
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 389

15 tctaagaggt agagctaaag 20

<210> 390
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 390

ccagagatga gcaacttagg 20

<210> 391
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 391

40 ggccatgtaa attgctcatc 20

<210> 392
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 392

50 aaagaaacta tctgtattc 20

<210> 393
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 393

ttcttagtac ctggaagatg 20

65 <210> 394
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 394

 cattagatac ctggacacct 20
 10
 <210> 395
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 395
 20
 gtttcatgga actcagcgca 20

 <210> 396
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 396

 ctggagagca cctgcaatag 20
 35
 <210> 397
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 397
 45 tgaagggtag agaaatcata 20

 <210> 398
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 398

 ggaaactcac ttgtgaccg 20
 60
 <210> 399
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 399
 aggtgcaaga tggtcctctg 20
 5 <210> 400
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 400
 15 tgcacagagg tgcaagatgt 20
 <210> 401
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 401
 cacaagagta aggagcagag 20
 <210> 402
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 402
 gatggatggt gagaaattac 20
 40 <210> 403
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 403
 50 tagacaattg agactcagaa 20
 <210> 404
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 60 <400> 404
 atgtgcacac aaggacatag 20
 65 <210> 405
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 405

 acatacaaat ggcaataggc 20
 10
 <210> 406
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 406
 20
 taggcaaagg acatgaatag 20

 <210> 407
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 407

 ttatgatagc tacagaataa 20
 35
 <210> 408
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 408
 45 ctgagattac ccgcagaatc 20

 <210> 409
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 409

 gatgtatgtc atataaaaga 20
 60
 <210> 410
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 410

ttccaatga cctgcattga 20

5 <210> 411
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 411

15 agggatgggc aatctggtag 20

<210> 412
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 412

ggctaataaa tagggtagtt 20

<210> 413
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 413

tcctagagca ctatcaagta 20

40 <210> 414
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 414

50 cctcctgggc ctgcagtcaa 20

<210> 415
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 415

catttgaca agtgtgtt 20

65 <210> 416
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 416

 ctgacacacc atgttattat 20
 10
 <210> 417
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 417
 20
 ctttttcaga ctagataaga 20

 <210> 418
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 418

 tcacacttac ctcgatgagg 20
 35
 <210> 419
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 419
 45 aagaaaatgg catcaggtt 20

 <210> 420
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 420

 ccaagccaat ctgagaaaga 20
 60
 <210> 421
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 421
aaatacacac ctgctcatgt 20

5 <210> 422
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 422

15 cttcacaat acacacctgc 20
<210> 423
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 423
agtggaagtt tggctcatt 20
<210> 424
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> oligonucleótido antisentido
<400> 424

40 ttgctagctt caaagtgaa 20
<210> 425
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 425

50 tcaagaataa gctccagatc 20
<210> 426
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 426
gcatacaagt cacatgaggt 20

65 <210> 427
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 427

 tacaagggtgt ttcttaagaa 20
 10
 <210> 428
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 428
 20
 atgcagccag gatgggccta 20

 <210> 429
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 429

 ttaccatatc ctgagagttt 20
 35
 <210> 430
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 430
 45
 gcaaaggtag aggaaggtat 20

 <210> 431
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 431

 aaggaccttc agcaaaggta 20
 60
 <210> 432
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 432
 cataggagta catttatata 20
 5 <210> 433
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial.
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 433
 15 attatgataa aatcaattt 20
 <210> 434
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 434
 agaaatttca ctagatagat 20
 <210> 435
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 435
 agcatatttt gatgagctga 20
 40 <210> 436
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 436
 50 gaaaggaagg actagcatat 20
 <210> 437
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 60 <400> 437
 cctctccaat ctgtagaccc 20
 65 <210> 438
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 438

 ctggataact cagaccttg 20
 10
 <210> 439
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 439
 20
 agtcagaaaa caacctattc 20

 <210> 440
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 440

 cagcctgcat ctataagtca 20
 35
 <210> 441
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 441
 45
 aaagaattac cctccactga 20

 <210> 442
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 442

 tctttcaaac tggctaggca 20
 60
 <210> 443
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 443
gcctggcaaa attctgcagg 20

5 <210> 444
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 444

15 ctacctcaaa tcaatatgtt 20

<210> 445
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 445

tgctttacct acctagctac 20

<210> 446
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 446

acctgtgtg tctcactcaa 20

40 <210> 447
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 447

50 atgcattccc tgactagcac 20

<210> 448
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 448

catctctgag ccccttacca 20

65 <210> 449
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 449

 gctgggcatg ctctctccc 20
 10
 <210> 450
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 450
 20
 gctttcgag ctgggcatgc 20

 <210> 451
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 451

 actccttct atacctggct 20
 35
 <210> 452
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 452
 45
 attctgcctc ttagaaagt 20

 <210> 453
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 453

 ccaagcctct ttactgggct 20
 60
 <210> 454
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 454
cactcatgac cagactaaga 20

5 <210> 455
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 455

15 acctcccaga agccttccat 20
<210> 456
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 456
ttcatatgaa atctctact 20
<210> 457
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> oligonucleótido antisentido
<400> 457

40 tatttaattt actgagaaac 20
<210> 458
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido antisentido
<400> 458

50 taatgtgttg ctggtgaaga 20
<210> 459
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 459
catctctaac ctggtgtccc 20

65 <210> 460
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 460

 10 gtgccatgct aggtggccat 20
 <210> 461
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 461
 20 agcaaattgg gatctgtgct 20
 <210> 462
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30 <400> 462

 tctggaggct cagaaacatg 20
 35 <210> 463
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 463
 45 tgaagacagg gagccaccta 20
 <210> 464
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 464

 aggattcca agactttgga 20
 60 <210> 465
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 465
cagctctaata ctaaagacat 20

5 <210> 466
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 466

15 gaataactcac cttctgcttg 20

<210> 467
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 467

atctctctgt cctcatcttc 20

<210> 468
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 468

40 ccaactcccc ctttcttgt 20

<210> 469
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 469

50 tctgggccag gaagacacga 20

<210> 470
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 470

tattgtgtgc tgggcactgc 20

65 <210> 471
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 471

 10 tgcttcgcac ctggacgagt 20
 <210> 472
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 472
 20 cctctttac ctaggtggc 20
 <210> 473
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30 <400> 473

 gctctctctg ccactctgat 20
 35 <210> 474
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 474
 45 aacttctaaa gccaacattc 20
 <210> 475
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 475

 tgtgtcaca ctatggtaaa 20
 60 <210> 476
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 476

agacacatac cataatgcca 20

5 <210> 477
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 477

15 ttctctcat ctgaaaatac 20

<210> 478
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 478

tgaggatgta attagcactt 20

<210> 479
30 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 479

agctcattgc ctacaaaatg 20

40 <210> 480
<211> 20
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 480

50 gttctcatgt ttactaatgc 20

<210> 481
<211> 20
55 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

60 <400> 481

gaattgagac aacttgattt 20

65 <210> 482
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 482

 ccggccatcg ctgaaatgaa 20
 10
 <210> 483
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 483
 20
 catagctcac ctgcacatt 20

 <210> 484
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 484

 cggtgcaccc ttacctgag 20
 35
 <210> 485
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 485
 45
 tccccagatc ctaacataaa 20

 <210> 486
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 486

 ttgaatgaca ctagatttc 20
 60
 <210> 487
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 487

aaaatccatt ttctttaaag 20

5 <210> 488
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 488

15 cagctcacac ttattttaa 20

 <210> 489
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 489

 gttcccaaaa ctgtatagga 20

30 <210> 490
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 490

40 agctccatac tgaagtcctt 20

45 <210> 491
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 491

55 caattcaata aaagctccat 20

60 <210> 492
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

65 <400> 492

 gttttcaaaa ggtataaggt 20

70 <210> 493
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 493

 10 ttccattcc ctgaaagcag 20

 <210> 494
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 494
 20
 tggatttac ctgaggctg 20

 <210> 495
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 30
 <400> 495

 ataaataata gtgctgatg 20
 35
 <210> 496
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 496
 45 ctatggctga gctgcctat 20

 <210> 497
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 497

 ctcttgaaa aatataccct 20
 60
 <210> 498
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 498
 ttgatgtatc tcatctagca 20

5 <210> 499
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 499

15 tagaaccatg ttggtcttc 20
 <210> 500
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 500
 ttctcttta tcacatgccc 20
 <210> 501
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 501

40 tatagtacac taaaactca 20
 <210> 502
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 502

50 ctggagagga ctaaacagag 20
 <210> 503
 <211> 568
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <220>
 <221> característica_misc
 60 <222> 44, 99, 156, 468
 <223> n = A,T,C o G
 <400> 503

ES 2 420 914 T3

ccaaaagatt gattgactgt ccattcaaag ctacacgcaa tttntgatat acatcacgta 60
 gttactgaaa aagctgcaat caacacagtt catggaccnc taccatgaag cttgctccag 120
 gagaaattct atcattcctc taatttttta aaaganatct tcatttatte ttcttttcca 180
 attgaacttt cacatagcac agaaaaaatt caaactgcct atattgataa aaccatacag 240
 tgagccagcc ttgcagtagg cagtagacta taagcagaag cacatatgaa ctggacctgc 300
 accaaagctg gcaccagggc tcggaaggtc tctgaactca gaaggatggc attttttgca 360
 agttaagaa aatcaggatc tgagtatttt tgctaaactt gggggaggag gaacaaataa 420
 atggagtctt tattgtgtat cataccactg aatgtggctc atttgtanta aaagacagtg 480
 aaacgagggc attgataaaa tgttctggca cagcaaaacc tctagaacac atagtgtgat 540
 ttaagtaaca gaataaaaat ggaaacgg 568

- 5 <210> 504
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 504
- 15 acattttatc aatgccctcg 20
 <210> 505
 <211> 20
 <212> ADN
- 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
- 25 <400> 505
 gccagaacat ttatcaatg 20
 <210> 506
 <211> 20
 <212> ADN
- 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
- 35 <400> 506
 agaggttttg ctgtgccaga 20
 <210> 507
 <211> 20
 <212> ADN
- 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
- 45 <400> 507
- 50 ctagaggttt tgctgtgcca 20

<210> 508
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 10 <400> 508
 tctagagggtt ttgctgtgcc 20

 <210> 509
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 509
 aatcacacta tgtgttctag 20
 25
 <210> 510
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 510
 35 aaatcacact atgtgttcta 20

 <210> 511
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 511
 taaatcacac tatgtgttct 20

 50 <210> 512
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 512
 60 cttaaatacac actatgtgtt 20

 <210> 513
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 513
 5 tattctgtta cttaaatcac 20
 <210> 514
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 514
 tggtagcctc agtctgcttc 20
 20 <210> 515
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 515
 30 agtctgcttc gcgccttctg 20
 <210> 516
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> H. sapiens
 <400> 516
 gcgccagggc cgaagaggaa 20
 40 <210> 517
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 45 <400> 517
 caggatgag ctcaagctgg 20
 50 <210> 518
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 55 <400> 518
 catcctgaac atcaagaggg 20
 60 <210> 519
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 519
 65 gggcagtggt atcgcttcaa 20

<210> 520
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> H. sapiens

 <400> 520

 10 cacttgctct catcaaaggc 20

 <210> 521
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> H. sapiens

 <400> 521

 cacttggtgac gctaagagga 20

 20 <210> 522
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 25 <400> 522

 cgctgagcca cgcggtcaac 20

 <210> 523
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 <400> 523
 35 tgtccaaatt ctaccatggg 20

 <210> 524
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 <400> 524

 45 cagctgacct catcgagatt 20

 <210> 525
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> H. sapiens

 <400> 525

 gtcaagttcc tgatggtgc 20

 55 <210> 526
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

 60 <400> 526

 agctgcttct gatgggtgcc 20

 65 <210> 527
 <211> 20

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 527
 5 gggcatcatc attccggact 20
 <210> 528
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 528
 15 cctactatcc gctgaccggg 20
 <210> 529
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens
 <400> 529
 25 gggccaccta agttgtgaca 20
 <210> 530
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> H. Sapiens
 <400> 530
 agaacatggg attgccagac 20
 35 <210> 531
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40 <400> 531
 ctccacttca agtctgtggg 20
 <210> 532
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 532
 50 cagagcttgg cctctctggg 20
 <210> 533
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 533
 60 tggccgcttc agggaacaca 20
 <210> 534
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

	<400> 534	
	cagctgagca gacaggcacc	20
5	<210> 535 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 535	
	gggagagaca agtttcacat	20
15	<210> 536 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 536	
	gtactgcac tcggattcaa	20
25	<210> 537 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 537	
30	gtgaggtgac tcagagactc	20
35	<210> 538 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 538	
40	ttgcagagca atattctatc	20
45	<210> 539 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 539	
	aagcattggt agagcaaggg	20
50	<210> 540 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
55	<400> 540	
	ccgctggctc tgaaggagtc	20
60	<210> 541 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
65	<400> 541	
	tctagtcagg ctgacctgcg	20

	<210> 542	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> H. sapiens	
	<400> 542	
10	gggccacagt gttctaactg	20
	<210> 543	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> H. sapiens	
	<400> 543	
	aatcaagtgt catcacactg	20
20	<210> 544	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
25	<400> 544	
	gggtagtcat aacagtactg	20
30	<210> 545	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
35	<400> 545	
	agagcacacg gtcttcagtg	20
40	<210> 546	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 546	
45	ttacagctag agggcctctt	20
50	<210> 547	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 547	
55	caccgtgggc atggatatgg	20
60	<210> 548	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 548	
	gggaatctga tgaggaaact	20
65	<210> 549	
	<211> 20	

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 549
 5 tgtcaacaag taccactggg 20
 <210> 550
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 550
 15 acctgggata tacactaggg 20
 <210> 551
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. Sapiens
 <400> 551
 ccaagtatag ttggctggac 20
 25 <210> 552
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 30 <400> 552
 tacatgaagc ttgtccagg 20
 35 <210> 553
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 40 <400> 553
 atgtcagcct ggtctgtcca 20
 <210> 554
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 <400> 554
 50 gcacctccgg aagtacacat 20
 <210> 555
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 <400> 555
 60 ctgcagcttc atcctgaaga 20
 <210> 556
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. Sapiens

	<400> 556	
	tgagggcaaa gccttgctga	20
5	<210> 557 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
10	<400> 557	
	ccattccaga agggaagcag	20
15	<210> 558 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
20	<400> 558	
	cgaggaagg caatgtggca	20
25	<210> 559 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 559	
30	cctgtcaac tctgatcagc	20
35	<210> 560 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 560	
40	agcagccagt cctgtcagta	20
45	<210> 561 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 561	
	agcatgtggc agaagccatc	20
50	<210> 562 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
55	<400> 562	
	gagagcacca aatccacatc	20
60	<210> 563 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 563	
65	cctcagtgat gaagcagtca	20

<210> 564
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> H. Sapiens
 <400> 564
 gatagatgtg gtcacctacc 20
 10 <210> 565
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 15 <400> 565
 cctcagcaca gcagctgcga 20
 20 <210> 566
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 25 <400> 566
 gattctgcgg gtcattggaa 20
 30 <210> 567
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 35 <400> 567
 caaagccatc actgatgatc 20
 40 <210> 568
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 <400> 568
 45 agaaagctgc catccaggct 20
 <210> 569
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> H. Sapiens
 <400> 569
 caggagggtc ttctcagac 20
 55 <210> 570
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 60 <400> 570
 gagtccttca caggcagata 20
 65 <210> 571
 <211> 20

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 571
 5 tgccaatatc ttgaactcag 20
 <210> 572
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 572
 15 catcgagatt ggcttgaag 20
 <210> 573
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens
 <400> 573
 25 ggagctggat tacagttgca 20
 <210> 574
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> H. sapiens
 <400> 574
 caacatgcag gctgaactgg 20
 35 <210> 575
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40 <400> 575
 acattacatt tggctctac 20
 <210> 576
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 576
 50 ctcaggcgct tactccaacg 20
 <210> 577
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 577
 60 gggacaccag attagagctg 20
 <210> 578
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

	<400> 578	
	gagctccaga gagaggacag	20
5	<210> 579 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 579	
	atcggcagag tatgaccttg	20
15	<210> 580 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 580	
	caaggggtgtt attccatac	20
25	<210> 581 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 581	
30	gactcatctg ctacagctta	20
35	<210> 582 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 582	
40	gcaaatactc cagagatcta	20
45	<210> 583 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 583	
	ctctcctggg tgtttagac	20
50	<210> 584 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
55	<400> 584	
	atgaaggctg actctgtggt	20
60	<210> 585 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 585	
65	gggaccacag atgtctgctt	20

<210> 586
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> H. sapiens
 <400> 586
 ctggccggct caatggagag 20
 10 <210> 587
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 15 <400> 587
 gctgcgttct gaatatcagg 20
 20 <210> 588
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 25 <400> 588
 tgctgacatc ttaggcactg 20
 30 <210> 589
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 35 <400> 589
 aagtgtagtc tcctggtgct 20
 40 <210> 590
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 590
 45 caaaattcag tctggatggg 20
 <210> 591
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> H. sapiens
 <400> 591
 gggaaactac ggctagaacc 20
 55 <210> 592
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 60 <400> 592
 ctgcatgtgg ctggtaacct 20
 65 <210> 593
 <211> 20

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 593
 5 ccatgaccat cgatgcacat 20
 <210> 594
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 594
 15 atgggaaact cgctctctgg 20
 <210> 595
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens
 <400> 595
 25 agtcatcatc tcgtgtctag 20
 <210> 596
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> H. sapiens
 <400> 596
 gaatacagcc aggacttgga 20
 35 <210> 597
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40 <400> 597
 ggcgtggagc ttactggacg 20
 <210> 598
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 598
 50 gagatgagag atgccgttga 20
 <210> 599
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 599
 60 agtcttgatg agcactatca 20
 <210> 600
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

	<400> 600	
	ctaagtacca aatcagaatc	20
5	<210> 601 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 601	
	gtccatgagt taatcgagag	20
15	<210> 602 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 602	
	aggccacagt tgcagtgtat	20
25	<210> 603 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 603	
30	tctgattggt ggactcttgc	20
35	<210> 604 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 604	
40	gaagtcagtc ttcaggctct	20
45	<210> 605 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 605	
	ccagattctc agatgaggga	20
50	<210> 606 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
55	<400> 606	
	catctgtcat tgatgcactg	20
60	<210> 607 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
65	<400> 607	
	aggagatgtc aagggttcgg	20

	<210> 608	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> H. sapiens	
	<400> 608	
	ggaactattg ctagtgaggc	20
10	<210> 609	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
15	<400> 609	
	ctctctccat ggcaaatgtc	20
20	<210> 610	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
25	<400> 610	
	caccgtgact ttagtcaga	20
30	<210> 611	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
35	<400> 611	
	actgagttga gggccggga	20
40	<210> 612	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 612	
45	cacatatgaa ctggacctgc	20
50	<210> 613	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 613	
55	tctgaactca gaaggatggc	20
60	<210> 614	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 614	
	ggtgcgaagc agactgaggc	20
65	<210> 615	
	<211> 20	

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 615
 5 tcccaccggg acctgcgggg 20
 <210> 616
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 616
 15 caccgggacc tgcggggctg 20
 <210> 617
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens
 <400> 617
 25 ctgagtgccttctcggtg 20
 <210> 618
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> H. sapiens
 <400> 618
 ctcggttgct gccgctgagg 20
 35 <210> 619
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40 <400> 619
 tcggttgctg ccgctgagga 20
 <210> 620
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 620
 50 cggttgctgc cgctgaggag 20
 <210> 621
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 621
 60 gttgctgccg ctgaggagcc 20
 <210> 622
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

	<400> 622	
	ctgccgctga ggagcccgcc	20
5	<210> 623 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 623	
	accgcagctg gcgatggacc	20
15	<210> 624 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 624	
	cagctggcga tggacccgcc	20
25	<210> 625 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 625	
30	gaacttacta tcacacctta	20
35	<210> 626 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 626	
40	tccaattgaa ctttcacata	20
45	<210> 627 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 627	
	aaaattcaaa ctgcctatat	20
50	<210> 628 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
55	<400> 628	
	gataaaacca tacagtgagc	20
60	<210> 629 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
65	<400> 629	
	ataaaacat acagtgagcc	20

	<210> 630	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> H. Sapiens	
	<400> 630	
	aaccatacag tgagccagcc	20
10	<210> 631	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. Sapiens	
15	<400> 631	
	accatacagt gagccagcct	20
20	<210> 632	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
25	<400> 632	
	ccatacagtg agccagcctt	20
30	<210> 633	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
35	<400> 633	
	gtgagccagc cttgcagtag	20
40	<210> 634	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 634	
45	ccagccttgc agtaggcagt	20
50	<210> 635	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 635	
55	taggcagtag actataagca	20
60	<210> 636	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. Sapiens	
	<400> 636	
	gcagtagact ataagcagaa	20
65	<210> 637	
	<211> 20	

	<212> ADN	
	<213> H. Sapiens	
	<400> 637	
5	tgaactggac ctgcaccaaa	20
	<210> 638	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> H. Sapiens	
	<400> 638	
15	ctggacctgc accaaagctg	20
	<210> 639	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> H. Sapiens	
	<400> 639	
	ggacctgcac caaagctggc	20
25		
	<210> 640	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. Sapiens	
30		
	<400> 640	
	ctgcacaaa gctggcacca	20
35		
	<210> 641	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. Sapiens	
40		
	<400> 641	
	accaaagctg gcaccagggc	20
	<210> 642	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. Sapiens	
	<400> 642	
50	ctcggaaggt ctctgaactc	20
	<210> 643	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> H. Sapiens	
	<400> 643	
60	aactcagaag gatggcattt	20
	<210> 644	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> H. Sapiens	

	<400> 644	
	ctcagaagga tggcattttt	20
5	<210> 645 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
10	<400> 645	
	atcaggatct gagttatttt	20
15	<210> 646 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
20	<400> 646	
	aggatctgag ttattttgct	20
25	<210> 647 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 647	
30	ctgagttatt ttgctaaact	20
35	<210> 648 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 648	
40	attttgctaa acttggggga	20
45	<210> 649 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 649	
	taaactggg ggaggaggaa	20
50	<210> 650 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
55	<400> 650	
	ggaacaaata aatggagtct	20
60	<210> 651 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 651	
65	gtctgtaact caagcagaag	20

	<210> 652	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> H. sapiens	
	<400> 652	
10	ttgtaactca agcagaaggt	20
	<210> 653	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> H. sapiens	
	<400> 653	
	gtaactcaag cagaaggtgc	20
20	<210> 654	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
25	<400> 654	
	aactcaagca gaaggtgcga	20
30	<210> 655	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
35	<400> 655	
	ctcaagcaga aggtgcgaag	20
40	<210> 656	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 656	
45	caagcagaag gtgcgaagca	20
50	<210> 657	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 657	
55	agcagaaggt gcgaagcaga	20
60	<210> 658	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 658	
	cagaaggtgc gaagcagact	20
65	<210> 659	
	<211> 20	

	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 659	
5	gaaggtgcga agcagactga	20
	<210> 660	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 660	
15	aggtgcgaag cagactgagg	20
	<210> 661	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> H. sapiens	
	<400> 661	
25	gtgcgaagca gactgaggct	20
	<210> 662	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> H. sapiens	
	<400> 662	
	gcgaagcaga ctgaggctac	20
35	<210> 663	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
40	<400> 663	
	gaagcagact gaggctacca	20
	<210> 664	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 664	
50	agcagactga ggctaccatg	20
	<210> 665	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 665	
60	cagactgagg ctaccatgac	20
	<210> 666	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> H. sapiens	

	<400> 666	
	gactgaggct accatgacat	20
5	<210> 667 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 667	
	ctgaggctac catgacattc	20
15	<210> 668 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 668	
	gaggctacca tgacattcaa	20
25	<210> 669 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 669	
30	ggctaccatg acattcaaat	20
35	<210> 670 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 670	
40	ctaccatgac attcaaatat	20
45	<210> 671 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 671	
	cctgaagctg catgtggctg	20
50	<210> 672 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
55	<400> 672	
	tgaagctgca tgtggctggt	20
60	<210> 673 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
65	<400> 673	
	aagctgcatg tggctggtaa	20

	<210> 674	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> H. sapiens	
	<400> 674	
10	gctgcatgtg gctgtaacc	20
	<210> 675	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> H. sapiens	
	<400> 675	
	tgcatgtggc tggtaaccta	20
20	<210> 676	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
25	<400> 676	
	catgtggctg gtaacctaaa	20
30	<210> 677	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
35	<400> 677	
	tgtggctggt aacctaaaag	20
40	<210> 678	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 678	
45	tggtggttaa ctaaaaagga	20
50	<210> 679	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 679	
55	gctgtaacc taaaaggagc	20
60	<210> 680	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 680	
	tggtaaccta aaaggagcct	20
65	<210> 681	
	<211> 20	

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 681
 5 gtaacctaaa aggagcctac 20
 <210> 682
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 682
 15 aacctaaaag gagcctacca 20
 <210> 683
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens
 <400> 683
 25 cctaaaagga gcctaccaa 20
 <210> 684
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> H. sapiens
 <400> 684
 ggcgcggaagc agactgaggc 20
 35 <210> 685
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40 <400> 685
 cactatgttc atgaggagg 20
 <210> 686
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 686
 50 ccatcatagg ttctgacgtc 20
 <210> 687
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 687
 60 gaagctgatt gactcactca 20
 <210> 688
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

	<400> 688	
	ttgtaactca agcagaaggc	20
5	<210> 689 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 689	
	gtaactcaag cagaaggcgc	20
15	<210> 690 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 690	
	aactcaagca gaaggcgcga	20
25	<210> 691 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 691	
30	ctcaagcaga aggcgcgaag	20
35	<210> 692 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 692	
40	cagaaggcgc gaagcagact	20
45	<210> 693 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 693	
	gaaggcgcga agcagactga	20
50	<210> 694 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
55	<400> 694	
	aggcgcgaag cagactgagg	20
60	<210> 695 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
65	<400> 695	
	gcgcgaagca gactgaggct	20

<210> 696
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> H. sapiens
 <400> 696
 gaagcagact gaggtacca 20
 10 <210> 697
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 15 <400> 697
 cagaaggcgc gaagcagact 20
 20 <210> 698
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 25 <400> 698
 tctttctcct gtcttacaga 20
 30 <210> 699
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 35 <400> 699
 cccacgtag aagatgcgac 20
 40 <210> 700
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 700
 45 aatatgtag acatgagcca 20
 <210> 701
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> H. sapiens
 <400> 701
 cattagctgc attcaactg 20
 55 <210> 702
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 60 <400> 702
 actttcactc ctagtctgca 20
 65 <210> 703
 <211> 20

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 703
 5 ccatgtccag gtaagtcag 20
 <210> 704
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 704
 15 gcaccaggca cggatgtgac 20
 <210> 705
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens
 <400> 705
 25 gtgggggtccc agaggcactg 20
 <210> 706
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> H. sapiens
 <400> 706
 gctgatcggc cactgcagct 20
 35 <210> 707
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40 <400> 707
 tccacgtggc tggggaggtc 20
 <210> 708
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 708
 50 tgtaatgtat ggtgatcaga 20
 <210> 709
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 709
 60 gagagtaccc agtgggaaat 20
 <210> 710
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

	<400> 710	
	agtcagcatg ggcttcagcc	20
5	<210> 711 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 711	
	caaaagaatg actgtccaac	20
15	<210> 712 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 712	
	gaatgactgt ccaacaagtg	20
25	<210> 713 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 713	
30	tatctactgt aatttaaaat	20
35	<210> 714 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 714	
40	ctgatatggg tggagaacag	20
45	<210> 715 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 715	
	tctgggacag gtatgagctc	20
50	<210> 716 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
55	<400> 716	
	tgatagcagt ggcccttgaa	20
60	<210> 717 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
65	<400> 717	
	ggattggcgt gaaatactgg	20

<210> 718
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> H. sapiens
 <400> 718
 10 tgcccgaggt tcctcctgcc 20
 <210> 719
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> H. sapiens
 <400> 719
 gcactagcaa gaccacactc 20
 20 <210> 720
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 25 <400> 720
 caagaccaca ctctgcatag 20
 30 <210> 721
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 35 <400> 721
 tcctccatag gataccgtgt 20
 40 <210> 722
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 722
 45 ggatgtaggg cagcaaaacc 20
 50 <210> 723
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 723
 55 tctgcacaag gactccttgt 20
 60 <210> 724
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 724
 cagcctgtct cagtgaacat 20
 65 <210> 725
 <211> 20

	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 725	
5	caggatgctt ccagtcta	20
	<210> 726	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 726	
15	aaatgctcgt ctccaatctc	20
	<210> 727	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> H. sapiens	
	<400> 727	
	aactgtgta tccaaatcca	20
25		
	<210> 728	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
30	<400> 728	
	tgacatgggtg tgcttcttg	20
35		
	<210> 729	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
40	<400> 729	
	acactgggtgt tctggctacc	20
	<210> 730	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 730	
50	gtgttctggc cacctctagt	20
	<210> 731	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 731	
60	tcttggcata ggtcacagta	20
	<210> 732	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> H. Sapiens	

	<400> 732	
	atgtcaacag tagcacctcc	20
5	<210> 733 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
10	<400> 733	
	tagactcaga caagtctgga	20
15	<210> 734 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
20	<400> 734	
	cctaagttgc tcattctctgg	20
25	<210> 735 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
30	<400> 735	
	tgcgctgagt tccatgaaac	20
35	<210> 736 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
40	<400> 736	
	ctattgcagg tgctctccag	20
45	<210> 737 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 737	
	cagaggaaca tcttgacact	20
50	<210> 738 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
55	<400> 738	
	ctctgctcct tactcttgg	20
60	<210> 739 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
65	<400> 739	
	gtaatttctc accatccatc	20

	<210> 740	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> H. sapiens	
	<400> 740	
10	ttctgagtct caattgtcta	20
	<210> 741	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> H. sapiens	
	<400> 741	
	ctatgtcctt gtgtgcacat	20
20	<210> 742	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
25	<400> 742	
	gcctattgcc atttgtatgt	20
30	<210> 743	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
35	<400> 743	
	ctattcatgt ccttgccta	20
40	<210> 744	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 744	
45	gattctgcgg gtaatctcag	20
50	<210> 745	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 745	
55	tcaatgcagg tcattggaaa	20
60	<210> 746	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 746	
	ctaccagatt gaccatccct	20
65	<210> 747	
	<211> 20	

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 747
 5 tacttgatag tgctctagga 20
 <210> 748
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 748
 15 ttgactgcag gaccaggagg 20
 <210> 749
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens
 <400> 749
 25 aacaaacact tgtgcaaatg 20
 <210> 750
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> H. sapiens
 <400> 750
 aatgagacca aactccact 20
 35 <210> 751
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40 <400> 751
 ttccactttg aagctagcaa 20
 <210> 752
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 752
 50 gatctggagc ttattcttga 20
 <210> 753
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 753
 60 acctcatgtg acttgatgc 20
 <210> 754
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

	<400> 754	
	ttcttaagaa acaccttgta	20
5	<210> 755 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
10	<400> 755	
	taggcccatac ctggctgcat	20
15	<210> 756 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
20	<400> 756	
	aaactctcag gatatggtaa	20
25	<210> 757 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 757	
30	ataccttcct ctaccttgc	20
35	<210> 758 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 758	
40	tacctttgct gaagtcctt	20
45	<210> 759 <211> 20 <212> ADN <213> H. Sapiens	
	<400> 759	
	atctatctag tgaaatttct	20
50	<210> 760 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
55	<400> 760	
	tcagctcatc aaaatatgct	20
60	<210> 761 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 761	
65	atatgctagt ccttccttc	20

<210> 762
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> H. sapiens

 <400> 762
 caaaggtctg agttatccag 20
 10
 <210> 763
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 15
 <400> 763
 tgacttatag atgcaggctg 20
 20
 <210> 764
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 25
 <400> 764
 tcagtgagg gtaattctt 20
 30
 <210> 765
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 35
 <400> 765
 tgcctagcca gttgaaaga 20
 40
 <210> 766
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 766
 45 cctgcagaat ttgccaggc 20
 50
 <210> 767
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 767
 55 gtagctaggt aggtaaagca 20
 60
 <210> 768
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 768
 ttgagtgaga cacacaagg 20
 65
 <210> 769
 <211> 20

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 769
 5 gtgctagtca gggaatgcat 20
 <210> 770
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 770
 15 ggggagagag catgcccagc 20
 <210> 771
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens
 <400> 771
 25 gcatgcccag ctgcgaaagc 20
 <210> 772
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> H. sapiens
 <400> 772
 agccaggtat agaaaggagt 20
 35 <210> 773
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40 <400> 773
 aactttctaa gaggcagaat 20
 <210> 774
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 774
 50 tcttagtctg gtcagtgtg 20
 <210> 775
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 775
 60 agtaggagat ttcatatgaa 20
 <210> 776
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. sapiens

	<400> 776	
	tcttcaccag caacacatta	20
5	<210> 777 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 777	
	atggccacct agcatggcac	20
15	<210> 778 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 778	
	catgtttctg agcctccaga	20
25	<210> 779 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 779	
30	taggtggctc cctgtcttca	20
35	<210> 780 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 780	
40	tccaaagtct tgggaatcct	20
45	<210> 781 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 781	
	acaaagaaag ggggagttgg	20
50	<210> 782 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
55	<400> 782	
	tcgtgtcttc ctggcccaga	20
60	<210> 783 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
65	<400> 783	
	gcagtgccca gcacacaata	20

<210> 784
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> H. Sapiens
 <400> 784
 actcgtccag gtgcgaagca 20
 10 <210> 785
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 15 <400> 785
 gccacctaag gtaaagaagg 20
 20 <210> 786
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 25 <400> 786
 atcagagtgg cagagagagc 20
 30 <210> 787
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 35 <400> 787
 ttaccatag ttgtgacaca 20
 40 <210> 788
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 788
 45 cattttgtag gcaatgagct 20
 50 <210> 789
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 789
 gcattagtaa acatgagaac 20
 55 <210> 790
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 60 <400> 790
 ttcatttcag cgatggccgg 20
 65 <210> 791
 <211> 20

<212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 791
 5 gaaaatctag tgtcattcaa 20
 <210> 792
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 792
 15 tcctatacag tttgggaac 20
 <210> 793
 <211> 20
 <212> ADN
 20 <213> H. sapiens
 <400> 793
 aaggactca gtatggagct 20
 25 <210> 794
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 30 <400> 794
 atggagcttt tattgaattg 20
 35 <210> 795
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 40 <400> 795
 ccatcagcac tattatttat 20
 45 <210> 796
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 796
 50 ataggcaagc tcagccatag 20
 <210> 797
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 <400> 797
 60 tgctagatga gatacatcaa 20
 <210> 798
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> H. Sapiens

<400> 798
 gaagaccaa catggttcta 20
 5 <210> 799
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 10 <400> 799
 ctctgttttag tcctctccag 20
 <210> 800
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 <400> 800
 20 cattgataaa atgttctggc 20
 <210> 801
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 <400> 801
 30 tctggcacag caaacctct 20
 <210> 802
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> H. Sapiens
 <400> 802
 tggcacagca aaacctctag 20
 40 <210> 803
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. Sapiens
 45 <400> 803
 tagaacacat agtgtgattt 20
 50 <210> 804
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 55 <400> 804
 aacacatagt gtgatttaag 20
 <210> 805
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 65 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 805
ctttccgttg gaccctggg 20

5 <210> 806
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 806

15 tcccgctgt gacatgcatt 20

<210> 807
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

25 <400> 807

ttctacctcg cgcgatttac 20

<210> 808
30 <211> 432
<212> ADN
<213> O. cuniculus

<400> 808

35 gatctttacct tctccaagca aaatgcattg ctacgtgctg agtatcaggc tgattacaag 60
tcactgaggt tcttcaccct gctttctggg ttgttgaata cccatggtct tgaattaaat 120
gctgacatct tgggcactga caaatgaat actgctgctc acaaggcaac tctaagaatt 180
ggccaaaatg gagtatctac cagtgaaca accagcttga ggtacagtcc cctgatgctg 240
gagaatgagc tgaacgcaga gcttgccctt tctggggcat ctatgaaatt agcaacaaat 300
ggccgcttca aggaacacaa tgcaaaattc agcctagatg ggaaagctac cctcacagag 360
ttatccctgg gaagcgctta ccaggccatg attctgggtg ctgacagcaa gaacattttc 420
aacttcaaga tc 432

40 <210> 809
<211> 660
<212> ADN
<213> O. cuniculus

<400> 809

45

ES 2 420 914 T3

ctgggaaaac tcccacagca agttaatgat tatctgagta cattcaattg ggagagacaa 60
 gtttccagtg ccaaggagaa actaactact ttcacaaaaa attataaaat tacagagaat 120
 gatatacaaa ctgcattgga taatgccaaa atcaacttaa atgaaaaact gtctcaactt 180
 cagacatatg tgatataatt tgatcagtat attaaagata attttgatct acatgatatt 240
 aaaatagcta tagctagtat tatagatcaa atcatggaaa aattaaaaat tcttgatgaa 300
 cgttatcata tccgtgcaca ttttaattaaa tcaatccata atttatattt gtttattgaa 360
 gctattgatt ttaacaaaat tggaagtagt actgcatctt ggattcaaaa tgtggatacc 420
 aagtatcaag tcagaatctg gatacaagaa atattgcaac agtttaagac acagattcag 480
 aatacaaaaca tcccatacct ggctgaaaaa ctgaacaac agattgaggc tattgatgtc 540
 agagtgcatt tagatcaatt gagaactaca attccatttc gtataataaa ggacattatt 600
 gaacatttca aatactttgt tataaatatt attgaaaatt ttgaagtaat tgacaaaatc 660

<210> 810

<211> 543

5 <212> ADN

<213> O. cuniculus

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (45)

<223> n = a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

15 <222> (118)

<223> n = a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

20 <222> (148)

<223> n = a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

25 <222> (173)

<223> n = a, c, g, o t

<220>

<221> característica_misc

30 <222> (180)

<223> n = a, c, g, o t

<400> 810

ES 2 420 914 T3

cagaacatcg gagacaacgc attggatddd ctcaactaat ettanaatga agcaaaaatt 60
aagtttgata agtacaaagt tgaaaaatcg ctcaacaggc tccccaggac ctttcagnct 120
cctggataca ttattccaat tttcaatntt gaagtatctc cactcacaat agnagacgtn 180
agcattcagt catgtgatcc caaaatcaat aagcaccccc aatgtcacca tcctggattc 240
aagcttctat gtgccttcat atacattggc tctgccaatcc ctagagctgc cagtcttcca 300
tgtccccagg aatctactca aggtctctct tccagatttc aaggaattga aaaccattaa 360
caatattttt attccagcca tgggcaacat tacctatgaa ttttccttca aatcaacgat 420
cattacactg aataccaatg ctggacttta taaccaatca gacattgttg cccatatact 480
ttcttctctt tcatctgtca ttgatgcact acagtacaaa ttagagggca cgctcaagtt 540
tga 543

<210> 811

<211> 19

5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

10 <400> 811

aagcaccccc aatgtcacc 19

15 <210> 812
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 812

25 gggatggcag agccaatgta 20

<210> 813
<211> 29
<212> ADN
30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sonda

35 <400> 813

tcctggattc aagcttctat gtgccttca 29

40 <210> 814
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 814

50 tgcttgaga aggtaagatc 20

5 <210> 815
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 815
 10 gcgtgtctc cgatgtctg 20
 <210> 816
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20 <400> 816
 taatcattaa ctgctgtgg 20
 25 <210> 817
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 817
 35 tcagcacgta gcaatgcatt 20
 <210> 818
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 818
 gcctgatact cagcacgtag 20
 <210> 819
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 819
 caattgaatg tactcagata 20
 60 <210> 820
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 820
 5 acctcagtga cttgtaatca 20
 <210> 821
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 821
 cactggaaac ttgtctctcc 20
 <210> 822
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 822
 agtagtagt ttctcctgg 20
 30 <210> 823
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 823
 40 tcagtgccca agatgtcagc 20
 <210> 824
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 824
 attggaataa tgtatccagg 20
 55 <210> 825
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 825
 65 ttggcattat ccaatgcagt 20

<210> 826
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 826
 10 gttgccttgt gagcagcagt 20
 <210> 827
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 827
 attgtgagtg gagatacttc 20
 25 <210> 828
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 828
 35 catatgtctg aagttgagac 20
 <210> 829
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45 <400> 829
 gtagatactc catttggcc 20
 <210> 830
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 830
 ggatcacatg actgaatgct 20
 60 <210> 831
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 831
 5 tcaagctggt tgtgcactg 20
 <210> 832
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 832
 ggactgtacc tcaagctggt 20
 <210> 833
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 833
 gctcattctc cagcatcagg 20
 30 <210> 834
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 834
 40 ttgatctata atactagcta 20
 <210> 835
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 835
 atggaagact ggcagctcta 20
 55 <210> 836
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 836
 65 ttgtgttcct tgaagcgcc 20

<210> 837
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 837
 10
 tgtgcacgga tatgataacg 20
 <210> 838
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 838
 gaccttgagt agattcctgg 20
 25
 <210> 839
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 839
 35
 gaaatctgga agagagacct 20
 <210> 840
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 840
 gtagctttcc catctaggct 20
 50
 <210> 841
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 841
 gataactctg tgagggtagc 20
 60
 <210> 842
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido
 <400> 842
 5 atgttgccca tggctggaat 20
 <210> 843
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 15 <400> 843
 aagatgcagt actactcca 20
 <210> 844
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 844
 gcacccagaa tcatggcctg 20
 30 <210> 845
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 845
 40 cttgatactt ggtatccaca 20
 <210> 846
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 846
 cagtgtaatg atcgttgatt 20
 55 <210> 847
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 847
 65 taaagtccag cattggatt 20

<210> 848
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 848
 10
 caacaatgtc tgattggta 20
 <210> 849
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20
 <400> 849
 gaagaggaag aaaggatatg 20
 25
 <210> 850
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 850
 35
 tgacagatga agaggaagaa 20
 <210> 851
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 45
 <400> 851
 ttgtactgta gtgcatcaat 20
 <210> 852
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55
 <400> 852
 gcctcaatct gttgttcag 20
 60
 <210> 853
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> oligonucleótido antisentido

<400> 853

5 acttgagcgt gccctctaat 20

<210> 854
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

15 <400> 854

gaaatggaat tgtagttctc 20

<210> 855
20 <211> 479
<212> ADN
<213> M. fascicularis

<220>
25 <221> característica_misc
<222> (7)
<223> n = A,T,C o G

<220>
30 <221> característica_misc
<222> (469) .. (474)
<223> n = A,T,C o G

<221> característica_misc
35 <222> (476) .. (479)
<223> n = A,T,C o G

<400> 855

40 tgcgtcnaga ctccgcccc tactatccgc tgaccgggga caccagatta gagctggaac 60
tgaggcctac aggagaagtt gagcagtatt ctgtcagtc aacctatgag ctccagagag 120

aggacagagc cttggtggac accctgaagt ttgtaactca agcagaaggt gtaaagcaga 180

ctgaggctac catgacattc aaatataatc ggcagagtat gaccttgtcc agtgaagtcc 240

aaattccgga ttttgagggt gaccttggaa caatcctcag agttaatgat gaatctactg 300

agggcagaaa gtcttacaga ctcaccctgg acattcagaa ccagaaaatt actgaggtca 360

ccctcatggg ccacctaaagt tgtgacacaa aggaagaagg aaaaatcaaa ggtgttattt 420

ccgtaccccg tttgcaagca gaagccagaa gtgagatcct cgcccacann nnnnnnnn 479

<210> 856
45 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 856

gtccctcaac atctgaatgc 20

55 <210> 857

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 857

10 ctgctagcct ctggattga 20

 <210> 858
 <211> 20
 <212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

20 <400> 858

 ccttcctga aggttctcc 20

25 <210> 859
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

 <400> 859

35 ctcttactgt gctgtggaca 20

 <210> 860
 <211> 13938
 <212> ADN
 <213> H. sapiens

40 <400> 860

ctgggattgg	gacacacttt	ctggacactg	ctggccagtc	ccaaaatgga	acataaggaa	60
gtgggtcttc	tacttctttt	atctctgaaa	tcagcagcac	ctgagcaaag	ccatgtggtc	120
caggattgct	accatgggtg	tggacagagt	tatcgaggca	cgtactccac	cactgtcaca	180
ggaaggacct	gccaagcttg	gtcatctatg	acaccacatc	aacataatag	gaccacagaa	240
aactacccaa	atgctggcct	gatcatgaac	tactgcagga	atccagatgc	tgtggcagct	300
ccttattggt	atacagaggga	tcccgggtgc	aggtgggagt	actgcaacct	gacgcaatgc	360
tcagacgcag	aaggggactgc	cgctcgcgct	ccgactgtta	ccccgggtcc	aagcctagag	420
gctccttccg	aacaagcacc	gactgagcaa	aggcctgggg	tgcaggagtg	ctaccatggt	480
aatggacaga	gttatcgagg	cacatactcc	accactgtca	caggaagaac	ctgccaaagt	540
tggatcatcta	tgacaccaca	ctcgcatagt	cggaccccag	aatactaccc	aatgctggc	600
ttgatcatga	actactgcag	gaatccagat	gctgtggcag	ctccttattg	ttatacgagg	660
gatcccgggt	tcagggtggga	gtactgcaac	ctgacgcaat	gctcagacgc	agaaggga	720
gccgtcgctg	ctccgactgc	taccccggtt	ccaagcctag	aggctccttc	cgaacaagca	780
ccgactgagc	aaaggcctgg	ggtgcaggag	tgctaccatg	gtaatggaca	gagttatcga	840
ggcacatact	ccaccactgt	cacaggaaga	acctgccaag	cttgggtcatc	tatgacacca	900
cactcgcata	gtcggacccc	agaatactac	ccaaatgctg	gcttgatcat	gaactactgc	960
aggaaatccag	gttccgcttg	agctccttat	tggtatagca	gggatcccg	tgtcaggtgg	1020
gagtactgca	acctgacgca	atgctcagac	gcagaaggga	ctgccgtcgc	gcctccgact	1080
gttaccocgg	ttccaagcct	agaggctcct	tccgaacaag	caccgactga	gcaaaggcct	1140
gggggtgcagg	agtgtaccac	tggtaatgga	cagagttatc	gaggcacata	ctccaccact	1200
gtcacaggaa	gaacctgcca	agcttggta	cttatgacac	cacactcgca	tagtcggacc	1260
ccagaatact	acccaaatgc	tggtttgatc	atgaactact	gcaggaatcc	agatgctgtg	1320
gcagctcctt	atgtttatag	gagggatccc	ggtgtcaggt	gggagtactg	caacctgacg	1380
caatgctcag	acgcagaayg	gactgccgtc	gcgcctccga	ctgttaccct	ggttccaagc	1440
ctagagcctc	cttcgaacac	agcaccgact	gagcaaaagg	ctgggggtgca	ggagtgtctac	1500
catggtaatg	gacagagtta	tcgaggcaca	tactccacca	ctgtcacagg	aagaacctgc	1560
caagcttggt	catctatgac	accacactcg	catagtcgga	cccagaata	ctacccaa	1620
gctggcttga	tcatgaacta	ctgcaggaat	ccagatgctg	tggcagctcc	ttattgttat	1680
acgagggatc	ccggtgtcag	gtgggagtac	gtcaacctga	cgcaatgctc	agacgcagaa	1740
gggactgcgc	tcgcgcctcc	gactgttacc	ccggttccaa	gcctagaggc	tccttccgaa	1800
caagcaccga	ctgagcaaag	gcctgggggtg	cagcagtgct	acratggtaa	tggacagagt	1860
tatcgaggca	catactccac	cactgtcaca	ggaagaacct	gccaagcttg	gtcatctatg	1920
acaccacact	cgcctagtgc	gacccagaa	tactaccaa	atgctggctt	gatcatgaac	1980
tactgcagga	atccagatgc	tgtggcagct	ccttatgtgt	atcagaggga	tcccgggtgc	2040
agggtggagt	actgcaacct	gacgcaatgc	tcagacgcag	aagggaactgc	cgctcgccct	2100
ccgactgtta	ccccgggttc	aagcctagag	gctccttccg	aacaagcacc	gactgagcaa	2160
aggcctgggg	tgagggaatg	ctaccatggt	aatggacaga	gttatcgagg	cacatactcc	2220
accactgtca	caggagaagc	ctgccaaagt	tggtcatcta	tgacaccaca	ctcgcatagt	2280
cggaccccag	aatactaccc	aaatgctggc	ttgatcatga	actactgcag	gaatccagat	2340
gctgtggcag	ctccttattg	ttatacgagg	gatcccgggtg	tcagggtggga	gtactgcaac	2400
ctagcgcagt	gctcagacgc	agaaggga	gccgtcgcg	ctccgactgt	taccccggtt	2460
ccaagcctag	aggctccttc	cgaacaagca	ccgactgagc	aaaggcctgg	ggtgcaggag	2520
tgctaccatg	gtaatggaca	gagttatcga	ggcacatact	ccaccactgt	cacaggaaga	2580
acctgccaa	cttgggtcatc	tatgacacca	cactcgcata	gtcggacccc	agaatactac	2640
ccaaatgctg	gcttgatcat	gaactactgc	aggaatccag	atgctgtggc	agctccttat	2700
tgttatagca	gggatcccg	tgtcaggtgg	gagtactgca	acctgacgca	atgctcagac	2760
gcagaaggga	ctgccgtcgc	gcctccgact	gttaccocgg	ttccaagcct	agaggctcct	2820
tccgaacaag	caccgactga	gcaaaggcct	gggtgcagg	agtgtaccac	tggtaatgga	2880
cagagtattc	gaggcacata	ctccaccact	gtcacaggaa	gaacctgcca	agcttggta	2940
tctatgacac	cacactcgca	tagtcggacc	ccagaatact	acccaaatgc	tggcttgatc	3000
atgaactact	gcaggaatcc	agatgctgtg	gcagctcctt	attgttatag	gagggatccc	3060
ggtgtcaggt	gggagtactg	caacctgacg	caatgctcag	acgcagaag	gactgccgtc	3120
gcgcctccga	ctgttaccct	ggttccaagc	ctagaggtc	cttccgaaca	agcaccgact	3180
gagcaaaagg	ctgggggtgca	ggagtgtctac	tatggtaatg	gacagagtta	tcgaggcaca	3240
tactccacca	ctgtcacagg	aagaacctgc	caagcttgg	catctatgac	accacactcg	3300
catagtccga	cccagaata	ctacccaaat	gctggcttga	tcatgaacta	ctgcaggaat	3360
ccagatgctg	tggcagctcc	ttattgttat	acgagggatc	ccggtgtcag	gtgggagtac	3420
tgcaacctga	cgcaatgctc	agacgcagaa	gggactgccc	tcgcgcctcc	gactgttacc	3480
ccggttccaa	gcctagaggc	tccttccgaa	caagcaccga	ctgagcaaag	gcctgggggtg	3540
caggagtgtc	accatggtta	tggacagagt	tatcgaggca	catactccac	cactgtcaca	3600
ggaagaacct	gccaagcttg	gtcatctatg	acaccacact	cgcatagtcg	gacccagaa	3660
tactacccaa	atgctggcct	gatcatgaac	tactgcagga	atccagatgc	tgtggcagct	3720

```

ccttattggt atacgagggga tcccgggtgc aggtgggagt actgcaacct gacgcaatgc 3780
tcagacgcag aagggaactgc cgtcgcgcct ccccggttcc aagcctagag 3840
gctccttccg aacaagcacc gactgagcaa aggcctgggg tgcaggagtg ctaccatggt 3900
aatggacaga gtatcgagg cacatactcc accactgtca caggaagaac ctgccaagct 3960
tggtcatcta tgacaccaca ctcgcatagt cggacccag aatactacc aaatgctggc 4020
ttgatcatga actactgcag gaatccagat gctgtggcag ctccctattg ttatacgagg 4080
gatcccggtg tcagggtggga gtactgcaac ctgacgcaat gctcagacgc agaagggaact 4140
gccgtcgcgc ctccgactgt taccocggtt ccaagcctag aggtcccttc cgaacaagca 4200
ccgactgagc aaaggcctgg ggtgcaggag tgctaccatg gtaatggaca gaggttatcga 4260
ggcacatact ccaccactgt cacaggaaga acctgccaag cttggtcatc tatgacacca 4320
cactcgcata gtcggacccc agaatactac ccaaatgctg gcttgatcat gaactactgc 4380
aggaatcgac atgctgtggc atgctcttat tgttatacga gggatcccg tgctagggtg 4440
gagtactgca acctgacgca atgctcagac gcagaaggga ctgccgtcgc gcctccgact 4500
gttaccocgg ttccaagcct agaggctcct tccgaacaag caccgactga gcaaaggcct 4560
gggggtgcagg agtgctacca tggtaatgga cagagttatc gaggcacata ctccaccact 4620
gtcacaggaa gaacctgcca agcttgggtc tctatgacac cacactcgca tagtcggacc 4680
ccagaatact aacccaatgc tggcttgatc atgaactact gcaggaaatcc agatgctgtg 4740
gcagctcctt attgttatac gagggatccc ggtgtcagggt gggagtactg caacctgacg 4800
caatgctcag acgcagaagg gactgcgcgc agccctccga ctgttaccoc ggttccaagc 4860
ctagaggctc ctccgaaca agcaccgact gagcaaggc ctgggggtgca ggagtgtctac 4920
catggtaatg gacagagtta tcgaggcaca tactccacca ctgtcacagg aagaacctgc 4980
caagcttggt catctatgac accacactcg catagtcgga cccagaata ctacccaaat 5040
gctggccttga tcatgaacta ctgcaggaat ccagatgctg tggcagctcc ttattgttat 5100
acgagggatc ccggtgtcag gtgggagtac tgcaacctga cgcaatgctc agacgcagaa 5160
gggactgccg tcgcgcctcc gactgttacc ccggttccaa gcctagagge tccttccgaa 5220
caagcaccga ctgagcaaa gcttgggggtg caggagtgtc accatggtaa tggacagagt 5280
tatcgaggca catactccac cactgtcaca ggaagaacct gccaaacttg gtcactctatg 5340
acaccacact cgcatagtcg gacccagaa tactacccaa atgctggctt gatcatgaac 5400
tactgcagga atccagatgc tgtggcagct ccttattggt atacgagggga tcccgggtgc 5460
aggtgggagt actgcaacct gacgcaatgc tcagacgcag aagggaactgc cgtcgcgcct 5520
ccgactgtta ccccggttcc tgcaacctga aggcctagag gctccttccg aacaagcacc gactgagcaa 5580
aggctgggtg caggaagaac ctgccaaggt aatggacaga gttatcgagg cacatactcc 5640
accactgtca caggaagaac ctgccaaggt tggatcatc taacacccac ctgcctaggt 5700
cggaccccgag aatactacc aaatgtcggc ttgatcatga actactgca gaatccagat 5760
gctgtggcag ctccctattg ttatacgagg gatcccggtg tcagggtggga gtactgcaac 5820
cgaactgtct gcttgatcat agaaggact gcgtcgcgc ctccgactgt taccccggtt 5880
ccaagcctag aggtcccttc cgaaccagca ccgactgagc aaaggcctgg ggtgcaggag 5940
tgctaccatg gtaatggaca gagttatcga ggcacatact ccaccactgt cacaggaaga 6000
acctgccaag cttggtcatc tatgacacca cactcgcata gtcggacccc agaatactac 6060
ccaaatgctg gcttgatcat gaactactgc agaatccag atgctgtggc agctccttat 6120
tggttatacga gggatcccg tgctcagggtg gactactgca acctgacgca atgctcagac 6180
gcagaaggga ctgccgtcgc gcctccgact gttaccccg gtaccccggt ttccaagcct 6240
tcgaacaag caccgactga gcaaaggcct ggggtgcagg agtgctacca tggtaatgga 6300
cagagtatc gaggcacata ctccaccact gtcacaggaa gaacctgcca agcttgggtc 6360
tctatgacac cacactcgca tagtcggacc ccagaatact attgttatac gagggtatcc 6420
atgaactact gcaggaatcc agatgctgtg caacctgacg caatgctcag acgcagaagg gactgccgtc 6480
ggtgtcagggt gggagtactg ggttccaagc cttagaggctc cttccgaaca agcaccgact 6540
gcgcctccga ctgttaccoc ggagtgtctac catggtaatg gacagagtta tcatgatgac 6600
gagcaaggc ctgtcacagg aagaacctgc caagcttggt gatgaacta ctgcaggaat 6660
tactccacca ctgtcacagg gactactgtc acgagggatc ecggtgtcag gtgggagtac 6720
catagtcgga cccagaata ctacccaaat acgagggatc tgcgcctcc gactgttacc 6780
ccagatgctg tggcagctcc ttattgttat acgagggatc cgggtgtcag gtgggagtac 6840
tgcaacctga cgcaatgctc agacgcagaa gggactgccg tgcgcctcc gactgttacc 6900
ccggttccaa gcctagaggc tccttccgaa caagcaccga ctgagcaaa gcttgggtg 6960
caggagtgtc acctaggtaa tggacagagt tatcgaggca catactccac cactgtcaca 7020
ggaagaacct gccaaacttg gtcactatg acaccacact cgcatagtcg gacccagaa 7080
tactacccaa atgctggctt gatcatgaac tactgcagga atccagatgc tgtggcagct 7140
ccttattggt atacgagggga tcccgggtgc aggtgggagt actgcaacct gacgcaatgc 7200
tcagacgcag aagggaactgc cgtcgcgcct ccccggttcc aagcctagag 7260
gctccttccg aacaagcacc gactgagcaa aggcctgggg tgcaggagtg ctaccatggt 7320
aatggacaga gttatcgagg cacatactcc accactgtca caggaagaac ctgccaagct 7380
tggtcatcta tgacaccaca ctcgcatagt cggaccccg aatactacc aaatgctggc 7440
ttgatcatga actactgcag gaatccagat gctgtggcag ctccctattg ttatacgagg 7500

```

gatcccggtg	tcagggtggga	gtactgcaac	ctgacgcaat	gctcagacgc	agaagggact	7560
gccgtcgcg	ctccgactgt	taccccggtt	ccaagcctag	aggctccttc	cgaacaagca	7620
ccgactgagc	aaaggccttg	ggtgcaggag	tgctaccatg	gtaatggaca	gagttatcga	7680
ggcacatact	ccaccactgt	cacaggaaga	acctgccaa	cttgggtcatc	tatgacacca	7740
cactcgcata	gtcggacccc	agaatactac	ccaaatgctg	gcttgatcat	gaactactgc	7800
aggaatccag	atgctgtggc	agctccttat	tgttatacga	gggatcccg	tgtcagggtg	7860
gagtactgca	acctgacgca	atgctcagac	gcagaaggga	ctgccgtcgc	gcctccgact	7920
gttaccocgg	ttccaagcct	agaggctcct	tccgaacaag	caccgactga	gcagaggcct	7980
ggggtgcagg	agtgtacca	cggtaatgga	cagagttatc	gaggcacata	ctccaccact	8040
gtcactggaa	gaacctgcca	agcttgggtca	tctatgacac	cacactcgca	tagtcggacc	8100
ccagaatact	acccaaatgc	tggcttgatc	atgaactact	gcaggaatcc	agatgctgtg	8160
gcagctcatt	attgttatata	gagggatccc	ggtgtcagg	gggagtactg	caacctgacg	8220
caatgctcag	acgcagaagg	gactgccgtc	gcgcctccga	ctgttaccoc	ggttccaagc	8280
ctagaggctc	cttccgaaca	agcaccgact	gagcaaaggc	ctgggggtgca	ggagtgtctac	8340
catggtaatg	gacagagtta	tgcaggcaca	tactccacca	ctgtcacagg	aagaacctgc	8400
caagctctgg	catctatgac	accacactcg	catagtccga	cccagaata	ctacccaaat	8460
gctggcttga	tcatgaacta	ctgcaggaat	ccagatgctg	tggcagctcc	ttattgttat	8520
acgagggatc	ccggtgtcag	gtgggagtac	tgcaacctga	cgcaatgctc	agacgcagaa	8580
gggactgccg	tcgcgcctcc	gactgttacc	ccggttccaa	gcctagaggc	tccttccgaa	8640
caagcaccga	actagccaag	gcctggggtg	caggagtgtc	accatggtaa	tggacagagt	8700
tatcgaggca	catactccac	cactgtcaca	ggagaacctc	gccaagcttg	gtcatctatg	8760
acaccacact	cgcatagtcg	gacccagaa	tactacccaa	atgctggctt	gatcatgaac	8820
tactgcagga	atccagatgc	tgtggcagct	ccttattgtt	atcagaggga	tcctgggtgc	8880
aggtagggag	actgcaacct	gacgcaatgc	tcagacgcag	aagggaactg	cgtcgcgctc	8940
ccgactgtta	ccccgggtcc	aagcctagag	gctccttccg	aacaagcacc	gactgagcag	9000
aggcctgggg	tgccaggagt	ctaccacggt	aatggacaga	gttatcgagg	cacatactcc	9060
actactgtca	ctgggaagaa	ctgccaaagt	tgggtcatcta	tgacaccaca	ctcgcatagt	9120
ccgaccccca	aatactaccc	aaatgctggc	ttgatcatga	actactgcag	gaatccagat	9180
gctgtggcag	ctccttattg	ttatacagg	gatcccggtg	tcagggtggga	gtactgcaac	9240
ctgacgcaat	gctcagacgc	agaagggact	gccgtcgcg	ctccgactgt	taccccggtt	9300
ccaagcctag	aggctccttc	cgaacaagca	ccgactgagc	agaggcctgg	ggtgcaggag	9360
tggtaccacg	gtaagtgaat	gagttatcga	ggcacatact	ccaccactgt	cactggaaga	9420
acctgccaa	cttgggtcatc	tatgacacca	cactcgcata	gtcggacccc	agaataactac	9480
ccaaatgctg	gcttgatcat	gaactactgc	aggaatccag	atgctgtggc	agctccttat	9540
tgttatatac	gggatcccg	tgtcagggtg	gagtactgca	acctgacgca	atgctcagac	9600
gcagaaccca	ctgcccgtgc	gcctccgact	gttaccocgg	ttccaagcct	agaggctcct	9660
tcgaacaag	caccgactga	gcagaggcct	gggggtgcagg	agtgtctacca	cggtaatgga	9720
cagagtatat	gaggcacata	ctccaccact	gtcactggaa	gaacctgcca	agcttgggtca	9780
tctatgacac	cacactcgca	tagtcggacc	ccagaatact	acccaaatgc	tggcttgatc	9840
atgaactact	gcaggaatcc	agatgctgtg	gcagctcctt	attgtttatae	gagggatccc	9900
ggtgtcagg	gggagtactg	caacctgacg	caatgctcag	acgcagaagg	gactgccgtc	9960
gcgcctccga	ctgttaccoc	ggttccaagc	ctagaggctc	cttccgaaca	agcaccgact	10020
gagcagaggc	ctgggggtgca	ggagtgtctac	cacggtaatg	gacagagtta	tcgaggcaca	10080
tactccacca	ctgtcactgg	aagaacctgc	caagcttgg	catctatgac	accacactcg	10140
catagtccga	cccagaata	ctacccaaat	gctggcttga	tcatgaacta	ctgcaggaat	10200
ccagatccctg	tggcagcccc	ttattgttat	acgagggatc	ccagtgtcag	gtgggagtac	10260
tgcaacctga	cacaatgctc	agacgcagaa	gggactgccg	tcgcgcctcc	aactattacc	10320
ccgattccaa	gcctagaggc	tccttctgaa	caagcaccaa	ctgagcaaag	gcctgggggtg	10380
caggagtgtc	accacggaaa	tggacagagt	tatcaaggca	catacttcat	tactgtcaca	10440
ggaagaacct	gccaagcttg	gtcatctatg	acaccacact	cgcatagtcg	gacccagca	10500
tactacccaa	atgctggctt	gatcaagaac	tactgccgaa	atccagatcc	tgtggcagcc	10560
ccttgggtgtt	atacaacaga	tcccagtgtc	agggtgggagt	actgcaacct	gacacgatgc	10620
tcagatgcag	aatggactgc	cttcgtccct	ccgaatgtta	ttctggctcc	aagcctagag	10680
gctttttttg	aacaagcact	gactgaggaa	acccccgggg	tacaggactg	ctactacat	10740
tatggacaga	gttaccgagg	cacatactcc	accactgtca	caggaagaac	ttgccaagct	10800
tggctcatcta	tgacaccaca	ccagcatagt	cggaccccag	aaaactaccc	aaatgctggc	10860
ctgaccagga	actactgcag	gaatccagat	gctgagattc	gcccttgggtg	ttacaccatg	10920
gatccagtg	tcagggtggga	gtactgcaac	ctgacacaa	gcctggtgac	agaatcaagt	10980
gtccttgcaa	ctctcacgg	ggtcccagat	ccaagcacag	aggcttcttc	tgaagaagca	11040
ccaaacggagc	aaagccccgg	ggtccaggat	tgctaccatg	gtgatggaca	gagttatcga	11100
ggctcattct	ctaccactgt	cacaggaagg	acatgtcagt	cttggctctc	tatgacacca	11160
cactggcatc	agaggacaac	agaatattat	ccaaatggtg	gcctgaccag	gaactactgc	11220
aggaatccag	atgctgagat	tagtccttgg	tgttatacca	tggatcccaa	tgtcagatgg	11280

gagtactgca acctgacaca atgtccagtg acagaatcaa gtgtccttgc gacgtccacg 11340
gctgtttctg aacaagcacc aacggagcaa agccccacag tccaggactg ctaccatggg 11400
gatggacaga gtatcagagg ctcatctctc accactgtta caggaaggac atgtcagctc 11460
tggctctcta tgacaccaca ctggcatcag agaaccacag aatactacc aaatgggtgg 11520
ctgaccagga actactgcag gaatccagat gctgagattc gcccttgggt ttataccatg 11580
gatcccagtg tcagatggga gtactgcaac ctgacgcaat gtccagtgat ggaatcaact 11640
ctcctcacaa ctcccacggt ggtcccagtt ccaagcacag agcttccttc tgaagaagca 11700
ccaactgaaa acagcactgg ggtccaggac tgctaccgag gtgatggaca gaggatcga 11760
ggcacactct ccaccactat cacaggaaga acatgtcagt cttgggtcgt tatgacacca 11820
cattggcatc ggaggatccc attatactat ccaaatgctg gcctgaccag gaactactgc 11880
aggaatccag atgctgagat tgcgcccttg tgttacacca tggatcccag tgtcaggtgg 11940
gagtactgca acctgacacg atgtccagtg acagaatcga gtgtcctcac aactcccaca 12000
gtggccccgg ttccaagcac agaggctcct tctgaacaag caccacctga gaaaagccct 12060
gtgggtccagg attgtacca tgggtgatgga cggagtatc gaggcatac ctccaccact 12120
gtcacaggaa ggacctgtca atcttgggtc tctatgatac cacactggca tcagaggacc 12180
ccagaaaaat acccaaatgc tggcctgacc gagaactact gcaggaatcc agattctggg 12240
aaacacccct ggtgttacac aaccgatccg tgtgtgaggt gggagtactg caatctgaca 12300
caatgctcag aaacagaatc aggtgtccta gagactccca ctgttgttcc agttccaagc 12360
atggaggctc attctgaagc agcaccaact gagcaaaccc ctgtggtccg gcagtgtctac 12420
catggtaatg gccagagtta tgcaggcaca ttctccacca ctgtcacagg aaggacatgt 12480
caatcttggg catccatgac accacaccgg catcagagga cccagaaaa ctacccaaat 12540
gatggcctga caatgaacta ctgcaggaaat ccagatgccg atacaggccc ttggtgtttt 12600
accatggacc ccagcatcag gtgggagtac tgcaacctga cgcgatgctc agacacagaa 12660
gggactgtgg tgcctcctcc gactgtcatc caggttccaa gcctagggcc tccttctgaa 12720
caagctgta tgtttgggaa tgggaaaagga tacgggggca agaaggcaac cactgttact 12780
gggacgccc atggcgaatg ggctgccag gagccccata gacacagcac gttcattcca 12840
gggacaaaata aatgggcagg tctggaaaaa aattactgcc gtaaccctga tgggtgacatc 12900
aatgggtccct ggtgctacac aatgaatcca agaaaacttt ttgactactg tgatatccct 12960
ctctgtgcat cctcttcatt tgattgtggg aagcctcaag tggagccgaa gaaatgtcct 13020
ggaagcattg taggggggtg tgtggcccac ccacatctct ggccctggca agtcagctctc 13080
agaacaaggt ttggaaagca cttctgtgga ggcaccttaa tatcccaga gtgggtgtctg 13140
actgctgtct actgcttgaa gaagtctca aggcctcat ctacaaggt catcctgggt 13200
gnacaccaag aagtgaacct gttcaggaaa tagaagtgtc taggctgttc 13260
ttggagccca cacaagcaga tattgctctg ctaagctaa gcaggcctgc cgtcatcact 13320
gacaaagtaa tgccagcttg tctgccatcc ccagactaca tggtcaccgc caggactgaa 13380
tgttacatca ctggctgggg agaaaacca ggtacctttg ggactggcct tctcaaggaa 13440
gccagctcc ttgttattga gaatgaagtg tgcaatcact ataagtata ttgtgctgag 13500
catttggcca gaggcactga cagttgccag ggtgacagt gagggcctct gggttgcctc 13560
gagaaggaca aatacatttt acaaggagtc acttcttggg gtcttggctg tgcacgcccc 13620
aataagcctg gtgtctatgc tctgttttca aggtttgtta cttggattga gggatgatg 13680
agaaataatt aattggacgg gagacagagt gaagcatcaa cctacttaga agctgaaacg 13740
tgggtaagga tttagcatgc tggaaaataat agacagcaat caaacgaaga cactgttccc 13800
agctaccagc tatgccaac cttggcattt ttggtatttt tgtgtataag cttttaagggt 13860
ctgactgaca aattctgtat taagggtgtca tagctatgac atttgttaaa aataaactct 13920
gcacttattt tgatttga 13938

<210> 861
<211> 25
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

10 <400> 861

cagctcctta ttgttatagc aggga 25

15 <210> 862
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 862

25 tgcgtctgag cattgcgt 18

<210> 863

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sonda PCR
 <400> 863

10 cccggtgtca ggtgggagta ctgc 24
 <210> 864
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

20 <400> 864
 gcctcagtct tcttcgcacc 20
 <210> 865
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 865
 gcctcagtct tattcgcacc 20

35 <210> 866
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 866

45 gcctcagtat tattcgcacc 20
 <210> 867
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

55 <400> 867
 gcctcattat tattcgcacc 20

60 <210> 868
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 868
 5 gcctcattat tattagcacc 20
 <210> 869
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 869
 15 gcctcattat tattatcacc 20
 <210> 870
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 870
 gcctaattat tattatcacc 20
 30 <210> 871
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 871
 40 gcctcagtct gcttcgcac 19
 <210> 872
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 872
 gcctcagtct gcttcgca 18
 <210> 873
 55 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 873
 gcctcagtct gcttc 15
 65 <210> 874

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 874
 10 cctcagtctg cttcgcac 18
 <210> 875
 <211> 16
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20 <400> 875
 ctcagtctgc ttcgca 16
 <210> 876
 25 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 876
 tcagtctgct tcgc 14
 35 <210> 877
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 877
 45 gcctcagtct 10
 <210> 878
 <211> 10
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 878
 gcttcgcacc 10
 60 <210> 879
 <211> 20
 <212> RNA
 <2113> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido

<400> 879
 5 uugaagccau acaccucuu 20
 <210> 880
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 880
 15 ugaccaggac ugccuguucu 20
 <210> 881
 <211> 20
 20 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 25 <400> 881
 gaauagggcu guagcuguaa 20
 30 <210> 882
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 882
 40 uauacugauc aaauuguauc 20
 <210> 883
 <211> 20
 <212> RNA
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 50 <400> 883
 uggaauucug guaугugaag 20
 <210> 884
 55 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 884
 aaaucaaaug auugcuuugu 20
 65 <210> 885

<211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 885
 10 gugaugacac uugauuuaaa 20
 <210> 886
 <211> 20
 <212> RNA
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 20 <400> 886
 gaagcugccu cuucuucca 20
 <210> 887
 25 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 887
 gagaguuggu cugaaaaauc 20
 35 <210> 888
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 <400> 888
 45 gtgcgcgcga gcccgaaatc 20
 <210> 889
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido antisentido
 55 <400> 889
 cuucuggcau ccgguuuagt t 21
 60 <210> 890
 <211> 466
 <212> ADN
 <213> M. fascicularis
 65 <220>
 <221> característica_misc

<222> 9
<223> n = A,T,C o G

<400> 890

5

```
ggatcggcng accctgagct gcatatggct ggtaatctaa aaggagccta caaaataat 60
gaaataaaaac acatctatac catctcttct gctgccttat cagcaagcta caaagcagac 120

actgttgcta aggttcaggg tgtggagttt agccatcggc tcaacacaga catcgtctggg 180
ctggcttcag ccattgacat tagcacaaac tataattcag actcattgca tttcagcaat 240
gtcttccatt ctgtaatggc tccatttacc atgaccattg atacacatac aaatggcaac 300
gggaaacttg ttctctgggg agaacatact gggcagctgt atagcaaatt cctgttgaaa 360
gcagaacctc tggcattcac tttctctcat gattacaaag gctccacgag tcatcatctc 420
atgtctagga aaagcatcag tgcagctctt gaacacaaag tcagta 466
```

10

<210> 891
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

<400> 891

20

gcctcagtct gctttacacc 20

<210> 892
<211> 20
<212> ADN

25

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> oligonucleótido antisentido

30

<400> 892

agattaccag ccatatgcag 20

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido de 12 a 30 bases nucleicas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en donde dicho oligonucleótido es 100% complementario de dicho ácido nucleico e inhibe la expresión de la apolipoproteína B, comprendiendo dicho oligonucleótido al menos 8 bases nucleicas contiguas de SEQ ID NO:247.
2. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO:247.
3. Un oligonucleótido antisentido de 20 a 30 bases nucleicas de longitud dirigido a una molécula de ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, en donde dicho oligonucleótido hibrida específicamente con dicho ácido nucleico e inhibe la expresión de la apolipoproteína B, en donde el oligonucleótido tiene una secuencia que comprende SEQ ID NO:247.
4. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el oligonucleótido tiene una secuencia que consiste en SEQ ID NO:247.
5. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el oligonucleótido es un compuesto mimético de oligonucleótido.
6. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 5, en donde el oligonucleótido comprende al menos una unión fosforotioato, al menos un resto de 2'-O-metoxietil-azúcar, o al menos una 5-metilcitosina.
7. El oligonucleótido antisentido de la realización 5, en el que el oligonucleótido antisentido es un compuesto antisentido quimérico.
8. El oligonucleótido antisentido de la realización 7, en el que el oligonucleótido es un compuesto fosforotioato quimérico.
9. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 8, en donde el oligonucleótido comprende alas de 2'-metoxietoxi nucleótido y un hueco de 2'-desoxinucleótido.
10. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 9, en donde el oligonucleótido comprende diez 2'-desoxinucleótidos.
11. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el oligonucleótido es una sal farmacéuticamente aceptable.
12. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el oligonucleótido inhibe la expresión de ARNm que codifica la apolipoproteína B humana después de 16 a 24 horas en al menos 30%, o en al menos 50%, células HepG2 en 80% de confluencia a una concentración de 150 nM.
13. Una composición que comprende el oligonucleótido antisentido de cualquiera de las realizaciones 1 a 12, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
14. Un método para inhibir la expresión de la apolipoproteína B en células o tejidos *ex vivo* que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en condiciones tales que se inhibe la expresión de la apolipoproteína B.
15. Un oligonucleótido antisentido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una composición según la reivindicación 13, para uso en terapia o profilaxis de una enfermedad.
16. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o la composición de la reivindicación 13, para uso en el tratamiento de:
 - (a) hipercolesterolemia;
 - (b) una enfermedad cardiovascular;
 - (c) hiperlipidemia;
 - (d) diabetes; o
 - (e) obesidad;
- en un ser humano.
17. Uso de un oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de un medicamento para tratar:

- (a) hipercolesterolemia;
 - (b) una enfermedad cardiovascular;
 - (c) hiperlipidemia;
 - (d) diabetes; o
 - (e) obesidad;
- en un ser humano.

5

18. El oligonucleótido antisentido o la composición de la reivindicación 16, o el uso de la reivindicación 17, en donde la enfermedad cardiovascular es la aterosclerosis.

10

19. El oligonucleótido antisentido o la composición de la reivindicación 16, para uso en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

20. El uso de la reivindicación 17, en donde el medicamento es para tratar la hipercolesterolemia.

21. El oligonucleótido antisentido o la composición de la reivindicación 19, o el uso de la reivindicación 20, en donde la hipercolesterolemia es hipercolesterolemia familiar.