

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 845 644**

51 Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C07H 19/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2010 E 15180416 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2020 EP 2963116**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades relacionadas con sirtuina1 (SIRT1) mediante inhibición del transcrito del antisentido natural a sirtuina 1**

30 Prioridad:

04.03.2009 US 157255 P

06.11.2009 US 259072 P

02.12.2009 WO PCT/US2009/066445

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.07.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COLLARD, JOSEPH;
KHORKOVA SHERMAN, OLGA;
COITO, CARLOS y
DE LEON, BELINDA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 845 644 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de enfermedades relacionadas con sirtuina1 (SIRT1) mediante inhibición del transcrito del antisentido natural a sirtuina 1

- 5 Los casos de la divulgación comprenden oligonucleótidos que modulan la expresión y/o la función de SIRT1 y moléculas asociadas.

ANTECEDENTES

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

El documento WO 2010/065662 A2 se refiere al tratamiento de enfermedades relacionadas con la sirtuina 1 (SIRT1) mediante inhibición del transcrito del antisentido natural a sirtuina 1.

- 20 Bonauer et al. (Science, vol. 324, nº 5935, 26 de junio de 2009, páginas 1710-1713) se refiere al microARN-92a que controla la angiogénesis y la recuperación funcional de tejidos isquémicos en ratones.

BASE DE DATOS DE EMBL [en línea] 4 de marzo de 2000, "xj35b03.xl Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clon IMAGE: 2659181 3', mRNA sequence", recuperado del número de acceso de EBI. EM_EST:AW169958, número de acceso a la base de datos AW169958.

- 25 BASE DE DATOS DE EMBL [en línea] 23 de septiembre de 2008. "ADNc de retina de adulto de Mus musculus, biblioteca enriquecida de longitud completa de RIKEN, clon: A930026H04 producto: proteína hipotética, secuencia de inserción completa", recuperado del número de acceso de EBI. EM_EST: AK044604; número de acceso a la base de datos AK044604.

COMPENDIO

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

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

- 35 En un caso la divulgación proporciona métodos para inhibir la acción de un transcrito antisentido natural usando oligonucleótido(s) antisentido dirigidos a cualquier región del transcrito antisentido natural que da como resultado una regulación positiva del gen sentido correspondiente. También se contempla en este documento que la inhibición del transcrito antisentido natural puede lograrse mediante ARNsi, ribozimas y moléculas pequeñas, que se consideran dentro del alcance de la presente divulgación.

- 40 Un caso proporciona un método de modulación de la función y/o la expresión de un polinucleótido SIRT1 en células o tejidos de pacientes in vivo o in vitro que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud en donde dicho oligonucleótido tiene una identidad de secuencia de al menos el 50% con un complemento de un polinucleótido que comprende de 5 a 30 nucleótidos consecutivos dentro de los nucleótidos 1 a 1028 de SEQ ID NO: 3 o nucleótidos 1 a 429 de SEQ ID NO: 4, o nucleótidos 1 a 156 de SEQ ID NO: 5 o nucleótidos 1 a 593 de SEQ ID NO:6, 1 a 373 de SEQ ID NO: 7 y 1 a 1713 de SEQ ID NO: 8 (Figura 17) modulando de ese modo la función y/o expresión del polinucleótido SIRT1 en células o tejidos de pacientes *in vivo* o *in vitro*.

- 50 En otro caso preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos SIRT1, por ejemplo, nucleótidos establecidos en SEQ ID NO: 3 a 8, y cualquier variante, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NOS: 9 a 66 (Figuras 19 a 26).

Otro caso proporciona un método para modular la función y/o expresión de un polinucleótido SIRT1 en células o tejidos de paciente in vivo o in vitro, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido

antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, en donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con un complemento inverso del antisentido del polinucleótido SIRT1; modulando de este modo la función y/o expresión del polinucleótido SIRT1 en células o tejidos de paciente in vivo o in vitro.

5 Otro caso proporciona un procedimiento de modulación de la función y/o expresión de un polinucleótido de SIRT1 en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido de 5 a 30 nucleótidos de longitud, donde dicho oligonucleótido tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con un oligonucleótido antisentido para un polinucleótido antisentido de SIRT1; modulando de este modo la función y/o expresión del polinucleótido de SIRT1 en células o tejidos del paciente in vivo o in vitro.

10 En un caso preferido, una composición comprende uno o más oligonucleótidos antisentido que se unen a polinucleótidos SIRT1 con sentido y/o antisentido.

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

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

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

En otro caso preferido, los oligonucleótidos se administran a un paciente por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía intraperitoneal.

20 En otro caso preferido, los oligonucleótidos se administran en una composición farmacéutica. Un régimen de tratamiento comprende administrar los compuestos antisentido al menos una vez al paciente; sin embargo, este tratamiento puede modificarse para incluir múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento puede combinarse con uno o más tipos distintos de terapias.

En otro caso preferido, los oligonucleótidos están encapsulados en un liposoma o unidos a una molécula portadora (p. ej., colesterol, péptido TAT).

25 Otros aspectos se describen a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 Las características nuevas de la invención se establecen particularmente en las reivindicaciones anejas. Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente divulgación se obtendrán por referencia a la siguiente descripción detallada que establece casos ilustrativos, en los que se utilizan los principios de la divulgación, y las figuras adjuntas en las que:

35 La Figura 1 muestra los resultados de la PCR en tiempo Real de oligonucleótidos diseñados para CV396200 antisentido de SIRT. Los resultados muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 se aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los ARNsi diseñado para sirtas (sirtas_5, $P=0,01$). En las mismas muestras, los niveles de ARN de sirtas disminuyeron significativamente después del tratamiento con sirtas_5, pero no se modificaron después del tratamiento con sirtas_6 y sirtas_7, que tampoco tuvieron efecto sobre los niveles de ARNm de SIRT1 (Fig. 1B). sirtas_5, sirtas_6 y sirtas_7 corresponden a las SEQ ID NO: 32, 33 y 34 respectivamente.

40 La Figura 2 muestra los resultados del recorrido de oligonucleótidos a través del CV396200.1 antisentido de SIRT. Los resultados de la PCR en tiempo real muestran que los niveles del ARNm de SIRT1 en las células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con tres de los oligonucleótidos antisentido diseñados para sirtas. CUR-0292 a CUR-0309 corresponden a las SEQ ID NO: 9 a 26 respectivamente.

45 La Figura 3 muestra los resultados para los oligonucleótidos modificados con PS, ANB y 2'O Me en células HepG2 (Fig. 3A) y Vero76 (Fig. 3B). Los resultados de la PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con mezcla de oligonucleótidos antisentido diseñados PS, ANB, 2'O Me y 2'O Me a antisentido SIRT1. Los niveles de ARNm de SIRT1 en células Vero también aumentaron 48 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido modificados con PS y ANB a antisentido de SIRT1. Las barras indicadas como CUR-0245, CUR-0736, CUR 0688, CUR-0740 y CUR-0664 corresponden a las SEQ ID NO: 27 a 31 respectivamente.

50 La Figura 4 muestra los resultados de la PCR de las Biopsias de Grasa de Mono. Los resultados de la PCR en tiempo real muestran un aumento en los niveles de ARNm de SIRT1 en biopsias de grasa de monos a los que se les administró CUR-963, un oligonucleótido diseñado para CV396200.1 antisentido de SIRT1. CUR-963 corresponde a SEQ ID NO: 28.

La Figura 5 muestra los resultados de la PCR de hepatocitos primarios de hígado de mono. Los resultados de la PCR en tiempo real muestran un aumento en los niveles de ARNm de SIRT1 después del tratamiento con un oligonucleótido frente a antisentido de SIRT1. La barra indicada como CUR-0245 corresponde a SEQ ID NO: 27.

5 La Figura 6 muestra los resultados de los oligonucleótidos diseñados para CV396200 antisentido de SIRT. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 se incrementan significativamente en uno de los oligonucleótidos diseñados para CV396200 antisentido de SIRT1. Las barras indicadas como CUR-1230, CUR-1231, CUR-1232 y CUR-1233 corresponden a las SEQ ID NO: 35 a 38.

10 La Figura 7 muestra los resultados de los oligonucleótidos diseñados para CV428275 antisentido de SIRT. Los resultados de la PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 aumentan significativamente en dos de los oligonucleótidos diseñados para CV428275 antisentido de SIRT1. Las barras indicadas como CUR-1302, CUR-1304, CUR-1303 y CUR-1305 corresponden a las SEQ ID NO: 39 a 42.

15 La Figura 8 muestra los resultados de la PCR en tiempo real. Los resultados muestran un aumento significativo en los niveles de ARNm de SIRT1 en las células HepG2 48 horas después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos diseñados para BE717453 antisentido de SIRT. Las barras indicadas como CUR-1264, CUR-1265 y CUR-1266 corresponden a las SEQ ID NO: 43 a 45 respectivamente.

La Figura 9 muestra los resultados de la PCR en tiempo real. Los resultados muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con tres de los oligonucleótidos diseñados para AV718812 antisentido de SIRT1. Las barras indicadas como CUR-1294, CUR-1297, CUR-1295, CUR-1296 y CUR-1298 corresponden a las SEQ ID NO: 46 a 50 respectivamente.

20 La Figura 10 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de SIRT1 después del tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 aumentan significativamente en células HepG2 48 h después del tratamiento con dos de los oligos diseñados para AW169958 antisentido de SIRT1. Las barras indicadas como CUR-1381, CUR-1382, CUR-1383 y CUR-1384 corresponden a muestras tratadas con SEQ ID NOS: 51, 52, 53 y 54 respectivamente.

30 La figura 11 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de SIRT1 después del tratamiento de células 3T3 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 están significativamente aumentados en células 3T3 después de 48 h del tratamiento con tres de los oligonucleótidos diseñados para AK044604 antisentido de SIRT1 de ratón. Las barras indicadas como CUR-0949, CUR-0842, CUR-1098 y CUR-1099 corresponden a muestras tratadas con SEQ ID NOS: 61, 55, 65 y 66 respectivamente.

35 La figura 12 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de SIRT1 después del tratamiento de células 3T3 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 están significativamente aumentados en células 3T3 48 h después del tratamiento con cinco de los oligonucleótidos diseñados para AK044604 antisentido de SIRT1 de ratón. Las barras indicadas como CUR-0948, CUR-0949, CUR-0950, CUR-0951, CUR-0846 y CUR-0844 corresponden a muestras tratadas con SEQ ID NOS: 60, 61, 62, 63, 59 y 57 respectivamente.

40 La figura 13 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de SIRT1 después de tratamiento de células 3T3 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 están significativamente aumentados en células HepG2 48 h después del tratamiento con dos de los oligonucleótidos diseñados para AK044604 antisentido de SIRT1 de ratón. Las barras indicadas como CUR-0842, CUR-0844 y CUR-0845 se corresponden con muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 55, 57 y 58, respectivamente.

50 La figura 14 es un gráfico de resultados de PCR en tiempo real que muestra el cambio en veces + la desviación estándar en ARNm de SIRT1 después del tratamiento de células 3T3 con oligonucleótidos de fosforotioato introducidos usando Lipofectamine 2000, en comparación con el control. Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 están significativamente aumentados en células HepG2 48 h después del tratamiento con dos de los oligonucleótidos diseñados para AK044604 antisentido de SIRT1 de ratón. Las barras representadas como CUR-0843, CUR-0846 corresponden a muestras tratadas con las SEQ ID NOS: 56 y 59, respectivamente.

La Figura 15 muestra

55 SEQ ID NO: 1: Homo sapiens sirtuina (regulación 2 de información de tipo de apareamiento silencioso, homólogo) 1 (S. cerevisiae) (SIRT1), ARNm (Número de acceso NCBI: NM_012238.3)

SEQ ID NO: 2: secuencia genómica de SIRT (se muestran exones en letras mayúsculas, intrones en minúsculas).

La Figura 16 muestra

SEQ ID NO: 72: Mus musculus sirtuina 1 (regulación 2 de información de tipo de apareamiento silencioso, homólogo) 1 (S. cerevisiae) (SIRT1) ARNm (Número de acceso NCBI: NM_001159589)

5 SEQ ID NO: 73: secuencia genómica de SIRT (se muestran exones en letras mayúsculas, intrones en minúsculas).

La Figura 17 muestra

SEQ ID NO: 3: Secuencia antisentido natural expandida (CV396200 - expandida).

SEQ ID NO: 4 Secuencia antisentido natural (CV428275)

SEQ ID NO: 5: secuencia antisentido natural (BE717453)

10 SEQ ID NO: 6: secuencia antisentido natural (AV718812)

SEC ID NO: 7: Secuencia antisentido natural (AW169958)<

SEQ ID NO: 8: Secuencia antisentido natural de ratón (AK044604)

La Figura 18 muestra las SEQ ID NOS: 9 a 26, * indica enlace fosfotioato

La Figura 19 muestra las SEQ ID NOS: 27 a 31, * indica enlace fosfotioato, + indica ANB y m indica 2'O Me

15 La Figura 20 muestra las SEQ ID NOS: 32 a 34, los oligonucleótidos de ensayo de doble cadena diseñados para CV396200 antisentido de SIRT que corresponden a sirtas_5, sirtas_6 y sirtas_7 respectivamente

La Figura 21 muestra las SEQ ID NOS: 35 a 38 diseñadas para CV396200 antisentido de SIRT1.

La Figura 22 muestra las SEQ ID NOS: 39 a 42 diseñadas para CV428275 antisentido de SIRT1.

La Figura 23 muestra las SEQ ID NOS: 43 a 45 diseñadas para BE717453 antisentido de SIRT1.

20 La Figura 24 muestra las SEQ ID NOS: 46 a 50 diseñadas para AV718812 antisentido de SIRT1.

La Figura 25 muestra los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NOS: 51 a 54. * indica enlace fosfotioato.

La Figura 26 muestra los oligonucleótidos antisentido, SEQ ID NOS: 55 a 66. * indica enlace fosfotioato, + indica ANB

25 La Figura 27 muestra SEQ ID NO: 67 a 70. Las SEQ ID NO: 67 corresponden al exón 4 del CV396200 antisentido natural de SIRT1, las SEQ ID NO: 68, 69 y 70 corresponden a la secuencia del cebador directo, la secuencia del cebador inverso y la secuencia informadora respectivamente.

La Figura 28 muestra la SEQ ID NO: 71 que corresponde a CUR 962, * indica enlace fosfotioato y + indica ANB.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

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

Definiciones

La terminología utilizada en este documento tiene el objetivo de describir solo aspectos particulares y no pretende limitar la descripción. Como se usa en este documento, las formas singulares «un», «una» y «el», «la» pretenden incluir también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida en que las expresiones «que incluye», «incluye», «que tiene», «tiene», «con», o variantes de las mismas se usan en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, dichas expresiones pretenden ser inclusivas de una manera similar a la expresión «que comprende».

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular de acuerdo con lo determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, «alrededor de» puede significar dentro de 1 o más de 1 desviación estándar, de acuerdo con la práctica en la técnica. Como alternativa, "alrededor de" puede significar un intervalo de hasta el 20%, preferiblemente hasta el 10%, más preferiblemente hasta el 5%, y aún más preferiblemente hasta el 1% de un valor dado. Como alternativa, en particular con respecto a los sistemas o procedimientos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud de un valor, preferentemente dentro de 5 veces y más preferiblemente, dentro de 2 veces. Donde se describen valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, a menos que se indique lo contrario, el término "alrededor de" significa que debería asumirse dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Como se usa en este documento, el término «ARNm» significa (el)los transcrito(s) de ARNm actualmente conocido(s) de un gen dirigido, y cualquier transcrito adicional que pueda ser dilucidado.

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

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, "SIRT1" y "Sirtuina 1" son incluyentes de todos los miembros de la familia, mutantes, alelos, fragmentos, especies, secuencias codificantes y no codificantes, cadenas de polinucleótido sentido y antisentido, etc.

Como se usa en este documento, "SIRT1" se referirá al homólogo del regulador 2 de información de tipo de apareamiento silenciado y es un miembro de la familia de proteínas SIRTuin desacetilasa. La secuencia de aminoácidos de SIRT1 se puede encontrar en el número de acceso de Genbank NP-08509. SIRT1 es el homólogo humano de la proteína Sir2 de levadura y exhibe actividad desacetilasa dependiente de NAD.

- 5 Tal como se utilizan en el presente documento, las palabras Sirtuina 1, SIRT1, sirtuina, homólogo 1 de regulación de información de tipo de apareamiento silencioso 2, hSIR2, hSIRT1, sirtuin-1 deacetilasa dependiente de NAD, SIR2L1, proteína similar a SIR2 1, se consideran iguales en la bibliografía y se usan indistintamente en la presente solicitud.

- 10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "oligonucleótido específico para" u "oligonucleótido que se dirige a" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen diana. La estabilidad de los complejos y los dúplex puede determinarse mediante cálculos teóricos y/o ensayos in vitro. Los ensayos ilustrativos para determinar la estabilidad de los complejos y dúplex de hibridación se describen en los Ejemplos más adelante.

- 15 Como se usa en este documento, la expresión «ácido nucleico diana» abarca ADN, ARN (que comprende preARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de tal ARN, secuencias codificantes, no codificantes, polinucleótidos con sentido o antisentido. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con su ácido nucleico diana interfiere en la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos, que se hibridan específicamente con él, se denomina generalmente "antisentido". Las funciones del ADN que se va a interferir incluyen, por ejemplo, la replicación y la transcripción. Las funciones del ARN que se va a interferir incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, la translocación del ARN al sitio de traducción de proteína, la traducción de proteína del ARN, el empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y la actividad catalítica que pueda ser acoplada en o facilitada por el ARN. El efecto global de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de un producto codificado u oligonucleótidos.

- 25 La interferencia de ARN "ARNi" está mediada por moléculas de ARN bicatenario (ARNds) que tienen homología específica de secuencia con sus secuencias de ácido nucleico "diana" (Caplen, N. J., et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:9742-9747). En determinados casos de la presente divulgación, los mediadores son dúplex de ARN «de interferencia pequeños» (ARNsi) de 5-25 nucleótidos. Los ARNsi se derivan del procesamiento de ARNds por una enzima RNasa conocida como Dicer (Bernstein, E., et al., (2001) Nature 409: 363-366). Los productos dúplex de sARNi se reclutan en un complejo de sARNi multiproteína denominado RISC (complejo silenciador inducido por ARN). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree entonces que un RISC es guiado a un ácido nucleico diana (adecuadamente ARNm), donde el dúplex de sARNi interactúa de una forma específica de secuencia para mediar en la escisión en un modo catalítico (Bernstein, E., et al., (2001) Nature 409:363-366; Boutla, A., et al., (2001) Curr. Biol. 11:1776-1780). Los ARN de interferencia pequeños que pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación pueden sintetizarse y usarse de acuerdo con procedimientos que son bien conocidos en la técnica y que serán familiares para el experto en la materia. Los ARN de interferencia pequeños para su uso en los procedimientos de la presente divulgación comprenden adecuadamente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos (nt). En los ejemplos de casos no limitantes, los ARNsi pueden comprender de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 nt, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nt, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 nt, o aproximadamente 20-25 nucleótidos.

- 40 La selección de oligonucleótidos adecuados se facilita usando programas informáticos que alinean automáticamente secuencias de ácido nucleico e indican regiones de identidad u homología. Tales programas se usan para comparar secuencias de ácidos nucleicos obtenidas, por ejemplo, buscando en bases de datos tales como GenBank o secuenciando productos de PCR. La comparación de secuencias de ácidos nucleicos de un intervalo de especies permite la selección de secuencias de ácidos nucleicos que muestran un grado de identidad adecuado entre especies.
- 45 En el caso de genes que no han sido secuenciados, se realizan inmunotransferencias de Southern para permitir una determinación del grado de identidad entre genes en especies diana y otras especies. Al realizar inmunotransferencias de Southern a grados de rigurosidad variables, como es bien conocido en la técnica, es posible obtener una medida aproximada de la identidad. Estos procedimientos permiten la selección de oligonucleótidos que muestran un alto grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico diana en un sujeto que se va a controlar y un menor grado de complementariedad con secuencias de ácido nucleico correspondientes en otras especies. Un experto en la materia se dará cuenta de que hay una libertad considerable en la selección de regiones adecuadas de genes para su uso en la presente divulgación.

- 55 Por "ARN enzimático" se indica una molécula de ARN con actividad enzimática (Cech, (1988) J. American. Med. Assoc. 260, 3030-3035). Los ácidos nucleicos enzimáticos (ribozimas) actúan uniéndose primero a un ARN diana. Tal unión se produce a través de la parte de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. De este modo, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y luego se une a ARN diana mediante apareamiento de bases, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana.

- 60 Por "ARN señuelo" se entiende una molécula de ARN que imita el dominio de unión natural para un ligando. El ARN señuelo compete, por lo tanto, con la diana de unión natural para la unión de un ligando específico. Por ejemplo, se ha

mostrado que la sobreexpresión de ARN de respuesta de transactivación (TAR) del VIH puede actuar como un "señuelo" y se une de forma eficiente a la proteína tat del VIH, impidiendo de este modo que se una a secuencias TAR codificadas en el ARN del VIH (Sullenger et al., (1990), Cell, 63, 601-608). Esto pretende ser un ejemplo específico. Los expertos en la materia reconocerán que esto es solo un ejemplo, y fácilmente pueden generarse otros casos usando técnicas generalmente conocidas en la técnica.

Como se usa en este documento, el término «monómeros» típicamente indica monómeros unidos por enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos para formar oligonucleótidos que varían en tamaño de entre unas pocas unidades monoméricas, p. ej., de entre aproximadamente 3-4, a aproximadamente varios cientos de unidades monoméricas. Los análogos de enlaces fosfodiéster incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonatos, fosforoselenoato, fosforamidoato y similares, como se describe más completamente más adelante.

El término "nucleótido" cubre nucleótidos de origen natural, así como nucleótidos no de origen natural. Debe ser evidente para el experto en la materia que diversos nucleótidos que se consideraron anteriormente "no de origen natural" se han descubierto posteriormente en la naturaleza. De este modo, "nucleótidos" incluye no solamente las moléculas que contienen heterociclos de purina y pirimidina conocidas, sino también análogos heterocíclicos y tautómeros de las mismas. Los ejemplos ilustrativos de otros tipos de nucleótidos son moléculas que contienen adenina, guanina, timina, citosina, uracilo, purina, xantina, diaminopurina, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-deazaxantina, 7-deazaguanina, N4,N4-etanocitosina, N6,N6-etano-2,6-diaminopurina, 5-metilcitosina, 5-(C3-C6)-alquilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, pseudoisocitosina, 2-hidroxi-5-metil-4-triazolopiridina, isocitosina, isoguanina, inosina y los nucleótidos "que no son de origen natural" descritos en Benner et al., pat. de EE. UU. No. 5.432.272. El término "nucleótido" pretende cubrir todos y cada uno de estos ejemplos, además de análogos y tautómeros de los mismos. Nucleótidos especialmente interesantes son aquellos que contienen adenina, guanina, timina, citosina y uracilo, que se consideran como los nucleótidos de origen natural en relación con la aplicación terapéutica y diagnóstica en seres humanos. Los nucleótidos incluyen los azúcares naturales 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, p. ej., como se describe en Kornberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) así como sus análogos.

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

Tal como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el apareamiento de cadenas sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos. Un mecanismo de apareamiento implica la formación de puentes de hidrógeno, que pueden ser puentes de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o de Hoogsteen inverso, entre bases de nucleósidos o de nucleótidos (nucleótidos) complementarias de las cadenas de compuestos oligoméricos. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleótidos complementarios que se aparean mediante la formación de puentes de hidrógeno. La hibridación puede producirse en circunstancias variables.

Un compuesto antisentido es "específicamente hibridable" cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para causar una modulación de la función y/o actividad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones donde se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en condiciones donde se realizan ensayos en el caso de ensayos in vitro .

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

"Complementario", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de apareamiento preciso entre dos nucleótidos en una o dos cadenas oligoméricas. Por ejemplo, si una nucleobase en una determinada posición de

un compuesto antisentido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una nucleobase en una determinada posición de un ácido nucleico diana, siendo dicho ácido nucleico diana un ADN, ARN, o una molécula de oligonucleótido, entonces la posición del enlace de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera una posición complementaria. El compuesto oligomérico y el ADN, ARN, o molécula de oligonucleótido, adicional son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones complementarias en cada molécula está ocupado por nucleótidos que pueden formar puentes de hidrógeno entre sí. De este modo, "específicamente hibridable" y "complementariedad" son expresiones que se usan para indicar un grado suficiente de apareamiento preciso o complementariedad sobre un número suficiente de nucleótidos de modo que se produzca unión estable y específica entre el compuesto oligomérico y un ácido nucleico diana.

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

Como se usa en este documento, la expresión "Punto de Fusión Térmico (T_m)" se refiere a la temperatura, bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos, a la que el 50% de los oligonucleótidos complementarios a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Típicamente, las condiciones rigurosas serán aquellas a las que la concentración de sales es la concentración de iones Na (u otras sales) de al menos aproximadamente 0,01 a 1,0 M a pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30°C para oligonucleótidos cortos (p. ej., de 10 a 50 nucleótidos). También pueden lograrse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida.

Como se usa en este documento, "modulación" significa un incremento (estimulación) o una disminución (inhibición) de la expresión de un gen.

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

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

Los polinucleótidos derivados incluyen ácidos nucleicos sometidos a modificación química, por ejemplo, sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Los derivados, p. ej., oligonucleótidos derivados, pueden comprender

partes de origen no natural, tales como restos de azúcar alterados o enlaces entre azúcares. Ilustrativos entre estos son el fosforotioato y otras especies que contienen azufre que son conocidas en la técnica. Los ácidos nucleicos derivados también pueden contener marcadores, que incluyen radionucleótidos, enzimas, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Un polipéptido o péptido "derivado" es aquel que se modifica, por ejemplo, por glucosilación, pegilación, fosforilación, sulfatación, reducción/alquilación, acilación, acoplamiento químico o tratamiento suave con formalina. Un derivado también puede modificarse para contener un marcador detectable, tanto directa como indirectamente, que incluye, pero no se limita a, un radioisótopo, un marcador fluorescente y enzimático.

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

"Mamífero" incluye mamíferos de sangre caliente que típicamente están bajo atención médica (p. ej., seres humanos y animales domesticados). Ejemplos incluyen felinos, caninos, equinos, bovinos y seres humanos, además de solo seres humanos.

"Tratar" o "tratamiento" cubre el tratamiento de una patología en un mamífero e incluye (a) evitar que se produzca la patología en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero tiene predisposición a la patología, pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga; (b) inhibir la patología, p. ej., detener su desarrollo; y/o (c) aliviar la patología, p. ej., causar la regresión de la patología hasta que se alcance un criterio de valoración deseado. Tratar también incluye la mejora de un síntoma de una enfermedad (p. ej., reducir el dolor o molestia), en donde dicha mejora puede o no afectar directamente a la enfermedad (p. ej., causa, transmisión, expresión, etc.).

"Enfermedad o trastorno neurodegenerativo" se refiere a una amplia gama de enfermedades y trastornos del sistema nervioso central y periférico que incluyen, por ejemplo, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), demencia, esclerosis múltiple y otras enfermedades y trastornos asociados con la muerte de células neuronales.

"Enfermedad metabólica" se refiere a una amplia gama de enfermedades y trastornos del sistema endocrino que incluyen, por ejemplo, resistencia a la insulina, diabetes, obesidad, tolerancia a la glucosa, colesterol alto en sangre, hiperglucemia, dislipidemia e hiperlipidemia.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a cualquier tumor maligno, particularmente en el pulmón, riñón o tiroides. El propio cáncer se manifiesta como un "tumor" o tejido que comprende células malignas del cáncer. Los ejemplos de tumores incluyen sarcomas y carcinomas como tales, pero no limitados a: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomioma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, citadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrional, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma. Como se ha indicado anteriormente, la divulgación permite específicamente el diagnóstico diferencial de tumores pulmonares, renales y tiroideos.

Composiciones y Moléculas de Polinucleótidos y Oligonucleótidos

"Proteína SIRT1" se refiere a un miembro de la familia sir2 de sirtuin desacetilasas. En un caso, una proteína SIRT1 incluye levadura Sir2 (número de acceso de GenBank P53685), C. elegans Sir-2.1 (número de acceso de GenBank NP.sub.--501912), SIRT1 humano (número de acceso de GenBank NM.sub.--012238 y NP.sub.--036370 (AF083106))

"Sirtuinas" SIRT1 son proteínas que incluyen un dominio SIR2, un dominio definido como secuencias de aminoácidos que se puntúan como ciertos en la familia Pfam "SIR2" -PF02146 (adjunta al Apéndice). Esta familia se menciona en la base de datos de INTERPRO como descripción de INTERPRO (entrada IPR003000). Para identificar la presencia de un dominio "SIR2" en una secuencia de proteína y hacer la determinación de que un polipéptido o proteína de interés tiene un perfil particular, la secuencia de aminoácidos de la proteína se puede buscar en la base de datos Pfam de HMM (p. ej., la base de datos de Pfam, versión 9) utilizando los parámetros predeterminados (http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/HMM_search). El dominio SIR2 está indexado en Pfam como PF02146 y en INTERPRO como descripción de INTERPRO (entrada IPR003000). Se puede encontrar una descripción de la base de datos Pfam en "The Pfam Protein Families Database" Bateman A et al. (2002) Nucleic Acids Research 30(1):276-280 y Sonhammer et al. (1997) Proteins 28(3):405-420 y se puede encontrar una descripción detallada de los HMM,

por ejemplo, en Gribskov et al. (1990) Meth. Enzymol. 183:146-159; Gribskov et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4355-4358; Krogh et al. (1994) J. Mol. Biol. 235:1501-1531; y Stultz et al. (1993) Protein Sci. 2:305-314.

En un caso, las dianas comprenden secuencias de ácido nucleico de Sirtuina 1 (SIRT1), que incluyen, sin limitación, secuencias codificantes y/o no codificantes, con sentido y/o antisentido asociadas con SIRT1.

- 5 En casos preferidos, se usan oligonucleótidos antisentido para evitar o tratar enfermedades o trastornos asociados con Sirtuina 1 (SIRT1). Las sirtuinas (SIRT) son enzimas modificadoras de proteínas que se distribuyen de forma ubicua en todos los organismos. SIRT1 es un mamífero homólogo del regulador de información silencioso 2 nicotinamida-adenina-dinucleótido de levadura dependiente de desacetilasa (conocido como Sir2), que es el miembro de la familia SIRT mejor caracterizado. SIRT1 regula la fisiología de las células del linaje de adipocitos. Los
- 10 moduladores de la actividad de SIRT1 pueden usarse para mejorar, tratar o prevenir enfermedades y trastornos asociados con la fisiología adiposa, p. ej., obesidad, una enfermedad relacionada con la obesidad o un trastorno metabólico relacionado con la grasa.

- 15 SIRT1 regula la longevidad en varios organismos modelo y está involucrado en varios procesos en células de mamíferos que incluyen la supervivencia, diferenciación y metabolismo celular. La inducción de SIRT1, ya sea por compuestos activadores de SIRT como el resveratrol, o el acondicionamiento metabólico asociado con la restricción calórica, podría tener cualidades neuroprotectoras y así retrasar el proceso neurodegenerativo, promoviendo así la longevidad (Han SH, (2009) J Clin Neurol. Sep;5(3): 120-5.; Michan S, et al. (2007) Biochem J. 404(1): 1-13.).

- 20 Hay varios informes que apoyan un papel protector axonal para SIRT1 en el sistema neuronal. La degeneración axonal es una característica morfológica importante observada tanto en neuropatías periféricas como en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la esclerosis lateral amiotrófica (Fischer LR, et al. (2004) Exp Neurol 185:232-240; Stokin GB, et al. (2005) Science 307:1282-1288). La degeneración axonal generalmente ocurre en la etapa temprana de los procesos degenerativos y, a menudo precede o se correlaciona estrechamente con síntomas clínicos como el deterioro cognitivo (Yamamoto H, et al. (2007) Mol Endocrinol. 21 (8): 1745-1755).

- 25 En un caso preferido, los oligonucleótidos son específicos para polinucleótidos de SIRT1, que incluye, sin limitación, regiones no codificantes. Las dianas de SIRT1 comprenden variantes de SIRT1; mutantes de SIRT1, incluyendo SNP; secuencias no codificantes de SIRT1; alelos, fragmentos, y similares. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN antisentido.

- 30 De acuerdo con casos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no está limitada a polinucleótidos de SIRT1 solo, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos, regiones no codificantes y similares de SIRT1.

- En otro caso preferido, un oligonucleótido está dirigido a una secuencia antisentido natural (antisentido natural a las regiones codificantes y no codificantes) de dianas de SIRT1, incluyendo, sin limitación, variantes, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula de ARN o ADN antisentido.

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

- En algunos casos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad, entre el compuesto antisentido y la diana, es de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 60%. En algunos casos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%. En algunos casos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 70% a aproximadamente el
- 45 80%. En algunos casos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 90%. En algunos casos, la homología, identidad de secuencias o complementariedad es de aproximadamente el 90%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98%, aproximadamente el 99% o aproximadamente el 100%.

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

Un compuesto antisentido, ya sea ADN, ARN, quimérico, sustituido etc., se 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

causar una pérdida de utilidad y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias no diana en condiciones donde se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de los ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en el caso de los ensayos in vitro, en las condiciones en las que se realizan los ensayos.

5 En otro aspecto preferido, el direccionamiento de SIRT1 incluyendo sin limitación secuencias antisentido que se identifican y se expanden, usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc., una o más de las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 8, y similares, modulan la expresión o función de SIRT1. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

10 En otro caso preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de ácidos nucleicos establecidos en las SEQ ID NOS: 9 a 66 que incluyen secuencias antisentido que se identifican y expanden, usando, por ejemplo PCR, hibridación, etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Ejemplos de enlaces modificados o enlaces internucleotídicos comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro aspecto preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo.

15 El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato anteriormente señalados y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, *per se*, también se conoce y no necesita ser descrito en este documento.

20 La especificidad y sensibilidad de antisentido también es empleada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado oligonucleótidos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales y en el hombre. Los oligonucleótidos antisentido se han administrado de forma segura y eficaz a seres humanos y actualmente hay numerosos ensayos clínicos en marcha. Así, se establece que los oligonucleótidos pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

25 En casos de la presente divulgación, los compuestos antisentido oligoméricos, particularmente oligonucleótidos, se unen a moléculas de ácidos nucleicos diana y modulan la expresión y/o función de moléculas codificadas por un gen diana. Las funciones de ADN a interferir comprenden, por ejemplo, la replicación y la transcripción. Las funciones de ARN que se va a interferir comprenden todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, la translocalización del ARN al sitio de traducción de proteína, la traducción de proteína desde ARN, el empalme del ARN para producir una o más especies de ARNm, y la actividad catalítica que puede estar acoplada o facilitada por el ARN. Las funciones pueden regularse positivamente o inhibirse dependiendo de las funciones deseadas.

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

35 El direccionamiento de un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico particular, en el contexto de esta divulgación, puede ser un procedimiento multietapa. El procedimiento generalmente empieza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya función va a modularse. Este ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión está asociada a un trastorno o patología particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. En la presente divulgación, el ácido nucleico diana codifica la Sirtuina 1 (SIRT1).

40 El procedimiento de direccionamiento generalmente también incluye la determinación de al menos una región diana, segmento, o sitio dentro del ácido nucleico diana para que la interacción antisentido se produzca de forma que resulte el efecto deseado, p. ej., la modulación de la expresión. Dentro del contexto de la presente divulgación, el término "región" se define como una parte del ácido nucleico diana que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de los ácidos nucleicos diana hay segmentos. "Segmentos" se definen como partes más pequeñas o subpartes de regiones dentro de un ácido nucleico diana. "Sitios", como se usa en la presente divulgación, se define como posiciones dentro de un ácido nucleico diana.

45 En un caso preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a las secuencias antisentido naturales de la Sirtuina 1 (SIRT1) y modulan la expresión y/o la función de la Sirtuina 1 (SIRT1) (SEQ ID NO: 1). Ejemplos de secuencias antisentido incluyen las SEQ ID NO: 3 a 66.

50 En otro caso preferido, los oligonucleótidos antisentido se unen a uno o más segmentos de polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) y modulan la expresión y/o función de la Sirtuina 1 (SIRT1). Los segmentos comprenden al menos cinco nucleótidos consecutivos de los polinucleótidos sentido o antisentido de Sirtuina 1 (SIRT1).

En otro caso preferido, los oligonucleótidos antisentido son específicos para secuencias antisentido naturales de Sirtuina 1 (SIRT1) en donde la unión de los oligonucleótidos a las secuencias antisentido naturales de Sirtuina 1 (SIRT1) modulan la expresión y/o función de la Sirtuina 1 (SIRT1).

En otro caso preferido, los compuestos oligonucleótidos comprenden secuencias antisentido establecidas como SEQ ID NOS: 9 a 66, secuencias antisentido que se identifican y expanden usando, por ejemplo, PCR, hibridación etc. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares. Ejemplos de enlaces modificados o uniones internucleotídicas comprenden fosforotioato, fosforoditioato o similares. En otro caso preferido, los nucleótidos comprenden un derivado de fósforo. El derivado de fósforo (o grupo fosfato modificado) que puede unirse al resto de azúcar o de análogo de azúcar en los oligonucleótidos modificados de la presente divulgación puede ser un monofosfato, difosfato, trifosfato, alquilfosfato, alcanofosfato, fosforotioato y similares. La preparación de los análogos de fosfato indicados anteriormente, y su incorporación en nucleótidos, nucleótidos modificados y oligonucleótidos, per se, es también conocida y no es necesario describirla en este documento.

Ya que se conoce en la técnica, el codón de iniciación de la traducción es típicamente 5'-AUG (en moléculas ARNm transcritos; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también se refiere como el "codón AUG," el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG; y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan in vivo. Así, las expresiones «codón de iniciación de la traducción» y «codón de inicio» pueden abarcar muchas secuencias de codón, aun cuando el aminoácido iniciador en cada caso típicamente sea metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). Los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, uno cualquiera de los cuales puede utilizarse preferentemente para la iniciación de la traducción en un tipo particular de célula o tejido, o en un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la divulgación, «codón de inicio» y «codón de iniciación de la traducción» se refieren al codón o codones que se usan in vivo para iniciar la traducción de un ARNm transcrito de un gen que codifica la Sirtuina 1 (SIRT1), independientemente de la(las) secuencia(s) de tales codones. Un codón de terminación de la traducción (o "codón de terminación") de un gen puede tener una de tres secuencias, es decir, 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente).

Los términos "región de codón de inicio" y "región de codón de iniciación de traducción" se refiere a una parte de tal ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos bien en cualquier dirección (i.e., 5' o 3') desde un codón de iniciación de la traducción. De forma análoga, las expresiones «región de codón de parada» y «región de codón de terminación de la traducción» se refieren a una parte de dicho ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (i.e. 5' o 3') desde un codón de terminación de la traducción. En consecuencia, la "región de codón de inicio" (o "región de codón de iniciación de la traducción") y la "región de codón de parada" (o "región de codón de terminación de la traducción") son todas las regiones que pueden ser dirigidas de manera efectiva con los compuestos antisentido de la presente divulgación.

El marco de lectura abierto (ORF) o "región de codificación" que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción es también una región que puede ser dirigida de manera efectiva. Dentro del contexto de la presente divulgación, una región dirigida es la región intragénica que abarca el codón de iniciación o de terminación de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) de un gen.

Otra región diana incluye la región 5' sin traducir (5'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción y por tanto que incluye nucleótidos entre el sitio 5' de terminación y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). Otra región diana más incluye la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la parte de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y que incluye, por lo tanto, nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm (o nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio caperuza 5' de un ARNm comprende un resto de guanosina N7 metilado unido al resto más 5' del ARNm mediante un enlace trifosfato 5'-5'. La región caperuza 5' de un ARNm se considera que incluye la propia estructura caperuza 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio caperuza. Otra región diana para esta descripción es la región caperuza 5'.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariótico están traducidos directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones," que se excinden de un transcrito antes de que sean traducidos. Las regiones restantes (y, por lo tanto, traducidas) se conocen como «exones» y se empalman juntas para formar una secuencia de ARNm continua. En un aspecto, el direccionamiento de sitios de empalme, es decir, las uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, es particularmente útil en situaciones donde el empalme aberrante está implicado en la enfermedad, o cuando una producción en exceso de un producto de empalme particular está implicada en la enfermedad. Una unión de fusión aberrante debido al reordenamiento o delección es otro aspecto de un sitio diana. Los transcritos de ARNm producidos mediante el proceso de empalme de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como «transcritos de fusión». Los intrones pueden ser eficazmente dirigidos usando compuestos antisentido dirigidos a, por ejemplo, ADN o pre-ARNm.

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

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

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

Los transcritos de ARN alternativos se pueden producir a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos son generalmente conocidos como «variantes». Más específicamente, las «variantes de pre-ARNm» son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de parada y contienen tanto secuencia intrónica como exónica.

Después de la excisión de uno o más regiones de exones o de intrones, o porciones de las mismas durante el empalme, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm". En consecuencia, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única siempre debe producir una variante de ARNm única como resultado del empalme. Estas variantes de ARNm también se conocen como «variantes de empalme alternativas». Si no se produce el empalme de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

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

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

Aunque las secuencias específicas de determinados segmentos diana se especifican en el presente documento, un experto en la materia reconocerá que estas sirven para ilustrar y describir casos particulares dentro del alcance de la presente divulgación. Los segmentos diana adicionales son fácilmente identificables por un experto en la materia en vista de esta divulgación.

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

Los segmentos diana pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 5' de uno de los segmentos diana ejemplares preferidos (siendo los nucleótidos restantes un alargamiento consecutivo del mismo ADN o ARN que comienza inmediatamente corriente arriba del extremo 5' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contiene aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). De forma similar, los segmentos diana preferidos se representan mediante secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos los 5 nucleótidos consecutivos desde el extremo 3' de uno de los segmentos diana preferidos ilustrativos (siendo los restantes nucleótidos un alargamiento consecutivo del mismo ADN o ARN que empieza inmediatamente corriente abajo del extremo 3' del segmento diana y que continúa hasta que el ADN o ARN contiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos). Un experto en la materia armado con los segmentos diana ilustrados en este documento será capaz, sin excesiva experimentación, de identificar segmentos diana preferidos adicionales.

Una vez que una o más regiones, segmento o sitios diana se han identificado, los compuestos antisentido se eligen para que sean lo suficientemente complementarios a la diana, es decir, se hibriden lo suficientemente bien y con suficiente especificidad para proporcionar el efecto deseado.

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

En un caso, se prefiere direccionar ácidos nucleicos específicos mediante oligonucleótidos antisentido. El direccionamiento de un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular es un procedimiento multietapa. El procedimiento generalmente empieza con la identificación de una secuencia de ácido nucleico cuya función va a modularse. Esta puede ser, por ejemplo, un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está

asociada a un trastorno o patología particular, o un polinucleótido no codificante tal como, por ejemplo, ARN no codificante (ARNnc).

Los ARN se pueden clasificar en (1) ARN mensajero (ARNm), que se traduce en proteínas, y (2) ARN de proteínas no codificantes (ARNnc). El ARNnc comprende microARN, transcritos antisentido y otras Unidades Transcripcionales (UT) que contienen una alta densidad de codones de terminación y que carece de cualquier "Marco de Lectura Abierto" extensivo. Muchos ARNnc parecen empezar a partir de sitios de iniciación en regiones no traducidas 3' (3'UTR) de loci codificantes de proteínas. Los ARNnc son frecuentemente raros y al menos la mitad de los ARNnc que se han secuenciado mediante el consorcio FANTOM no parecen estar poliadenilados. La mayoría de los investigadores se han basado, por motivos obvios, en ARNm poliadenilados que se procesan y se exportan al citoplasma. Recientemente, se ha mostrado que el conjunto de ARN nucleares no poliadenilados puede ser muy grande, y que muchos de dichos transcritos surgen de las llamadas regiones intergénicas (Cheng, J. et al. (2005) Science 308 (5725), 1149-1154; Kapranov, P. et al. (2005). Genome Res 15 (7), 987-997). El mecanismo por el que los ARNnc pueden regular la expresión génica es por apareamiento de bases con transcritos diana. Los ARN que funcionan por apareamiento de bases pueden agruparse en (1) ARN codificados en cis que están codificados en la misma ubicación genética, pero en la cadena opuesta a los ARN en los que actúan y, por lo tanto, muestran complementariedad perfecta con su diana, y (2) ARN codificados en trans que están codificados en una ubicación cromosómica distinta de los ARN en los que actúan y generalmente no presentan potencial de apareamiento de bases perfecto con sus dianas.

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

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

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

De acuerdo con la presente divulgación, los compuestos antisentido incluyen oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), compuestos de ARNsi, compuestos de interferencia (ARNi) de ARN mono o bicatenario tales como compuestos de ARNsi, y otros compuestos oligoméricos que se hibridan con al menos una parte del ácido nucleico diana y modulan su función. Como tales, pueden ser ADN, ARN, similares a ADN, similares a ARN, o mezclas de los mismos, o pueden ser miméticos de uno o más de estos. Estos compuestos pueden ser compuestos oligoméricos monocatenarios, bicatenarios, circulares o de horquilla y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias internas o terminales, desapareamientos o bucles. Los compuestos antisentido se preparan de forma habitual linealmente, pero pueden unirse o prepararse de otro manera para que sean circulares y/o ramificados. Los compuestos antisentido pueden incluir constructos tales como, por ejemplo, dos cadenas hibridadas para formar un compuesto completa o parcialmente bicatenario o una única cadena con autocomplementariedad suficiente para permitir la hibridación y formación de un compuesto completa o parcialmente bicatenario. Las dos cadenas pueden enlazarse internamente, dejando los extremos 3' o 5' libres o pueden enlazarse para formar una estructura de horquilla continua o bucle. La estructura de horquilla puede contener un nucleótido protuberante en cualquiera de los extremos 5' o 3' que produce una extensión del carácter monocatenario. Los compuestos bicatenarios opcionalmente pueden incluir nucleótidos protuberantes en los extremos. Las modificaciones adicionales pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleótido seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Como alternativa, las dos cadenas pueden enlazarse mediante un resto de ácido no nucleico o grupo conector. Cuando se forma a partir de solo una cadena, el ARNds puede adoptar la forma de una molécula tipo horquilla autocomplementaria que se dobla sobre sí misma para formar un dúplex. Así, el ARNds puede ser completa o parcialmente bicatenario. La modulación específica de la expresión génica puede lograrse mediante la expresión estable de horquillas de ARNds en líneas celulares transgénicas, sin embargo, en algunos aspectos, la expresión o función génica está regulada positivamente. Cuando se forma a partir de dos cadenas, o una sola cadena que adopta la forma de una molécula de tipo horquilla autocomplementaria que

se dobla sobre sí misma para formar un dúplex, las dos cadenas (o regiones formadoras de dúplex de una sola cadena) son cadenas de ARN complementarias que se aparean con bases en el modo de Watson-Crick.

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos deseados o compuestos antisentido comprenden al menos uno de: ARN antisentido, ADN antisentido, oligonucleótidos antisentido quiméricos, oligonucleótidos antisentido que comprenden enlaces modificados, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (ARNsi); un microARN interferente (ARNmi); un ARN temporal pequeño (ARNst); o un ARN de horquilla corto (ARNsh); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); ARN de activación pequeño (ARNsa), o combinaciones de los mismos.

El ARNs también puede activar la expresión génica, un mecanismo que se ha denominado «activación génica inducida por ARN pequeño» o ARNa. Los promotores génicos que se dirigen a ARNs inducen la potente activación transcripcional de los genes asociados. El ARNa se demostró en células humanas usando ARNs sintéticos, denominados «ARN de activación pequeño» (ARNsa). No se sabe actualmente si el ARNa se conserva en otros organismos.

Se ha descubierto que el ARN bicatenario pequeño (ARNdc), tal como ARN de interferencia pequeño (ARNsi) y el microARN (ARNmi), es el desencadenante de un mecanismo evolutivamente conservado conocido como interferencia por ARN (ARNi). La ARNi conduce invariablemente al silenciamiento génico mediante la remodelación de cromatina para suprimir de este modo la transcripción, la degradación de ARNm complementario, o el bloqueo de la traducción de proteínas. Sin embargo, en los aspectos descritos en detalle en la sección de ejemplos a continuación, se muestra que los oligonucleótidos aumentan la expresión y/o función de los polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) y los productos codificados de los mismos. Los ARNs también pueden actuar como ARN de activación pequeños (ARNsa). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, al dirigir las secuencias en los promotores génicos, los ARNs inducirían la expresión de genes diana en un fenómeno denominado activación transcripcional inducida por ARNs (ARNa).

En un aspecto adicional, los «segmentos diana preferidos» identificados en este documento pueden emplearse en un proceso de cribado de compuestos adicionales que modulan la expresión de polinucleótidos de sirtuina 1 (SIRT1). Los "moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica Sirtuina 1 (SIRT1) y que comprenden al menos una parte de 5 nucleótidos que es complementaria a un segmento diana preferido. El procedimiento de cribado comprende las etapas de poner en contacto un segmento diana preferido de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos sentido o antisentido naturales de Sirtuina 1 (SIRT1) con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1), por ejemplo, las SEQ ID NOS: 9 a 66. Una vez que se demuestra que el modulador o moduladores candidatos son capaces de modular (p. ej., tanto disminuir como aumentar) la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1), el modulador puede entonces emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1), o para uso como un agente de investigación, diagnóstico o terapéutico de acuerdo con la presente divulgación.

El direccionamiento de la secuencia antisentido natural modula preferentemente la función del gen diana. Por ejemplo, el gen SIRT1 (p. ej., número de acceso NM_012238.3, Fig. 15). En un aspecto preferido, la diana es un polinucleótido antisentido del gen de la Sirtuina 1. En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a secuencias con sentido y/o antisentido naturales de polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) (p. ej., número de acceso NM_012238.3, Fig. 15) variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a las mismas. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido y las dianas incluyen regiones codificantes y no codificantes de polinucleótidos antisentido y/o con sentido de SIRT1.

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

Se ha mostrado en la técnica que tales restos de oligonucleótido bicatenario modulan la expresión de la diana y regulan la traducción, así como el procesamiento de ARN mediante un mecanismo antisentido. Además, los restos bicatenarios pueden estar sujetos a modificaciones químicas (Fire et al., (1998) Nature, 391, 806-811; Timmons y Fire, (1998) Nature, 395, 854; Timmons et al., (2001) Gene, 263, 103-112; Tabara et al., (1998) Science, 282, 430-431; Montgomery et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 15502-15507; Tuschl et al., (1999) Genes Dev., 13, 3191-

3197; Elbashir et al., (2001) Nature, 411, 494-498; Elbashir et al., (2001) Genes Dev. 15, 188-200). Por ejemplo, tales restos bicatenarios han mostrado que inhiben la diana mediante la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex a la diana, desencadenando de ese modo la degradación enzimática de la diana (Tijsterman et al., (2002) Science, 295, 694-697).

- 5 En un aspecto preferido, un oligonucleótido antisentido se dirige a polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) (p. ej., número de acceso NM_012238.3), variantes, alelos, isoformas, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias a los mismos. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

De acuerdo con aspectos de la divulgación, la molécula de ácido nucleico diana no se limita a Sirtuina 1 (SIRT1) sola, sino que se extiende a cualquiera de las isoformas, receptores, homólogos y similares de las moléculas de Sirtuina 1 (SIRT1).

10 En otro caso preferido, un oligonucleótido se dirige a una secuencia antisentido natural de polinucleótidos SIRT1, por ejemplo, polinucleótidos establecidos como SEQ ID NO: 3 a 8, y cualquier variante, alelos, homólogos, mutantes, derivados, fragmentos y secuencias complementarias de los mismos. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NOS: 9 a 66.

- 15 En un aspecto, los oligonucleótidos son complementarios a, o se unen a, secuencias de ácido nucleico de Sirtuina 1 (SIRT1) antisentido, incluyendo sin limitación secuencias sentido y/o antisentido no codificantes asociadas con polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) y modulan la expresión y/o función de moléculas de Sirtuina 1 (SIRT1).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos son complementarios o se unen a secuencias de ácido nucleico de SIRT1 natural antisentido, expuestas como las SEQ ID NO: 3 a 8 y modulan la expresión y/o función de las moléculas SIRT1.

20 En un aspecto preferido, los oligonucleótidos comprenden secuencias de al menos 5 nucleótidos consecutivos de las SEQ ID NOS: 9 a 66 y modulan la expresión y/o función de las moléculas de Sirtuina 1 (SIRT1).

Las dianas polinucleótidas comprenden SIRT1, incluyendo miembros de la familia de las mismas, variantes de SIRT1; mutantes de SIRT1, incluyendo SNP; secuencias no codificantes de SIRT1; alelos de SIRT1; variantes de especies, fragmentos y similares. Preferiblemente, el oligonucleótido es una molécula antisentido.

25 En otro aspecto preferido, el oligonucleótido que se dirige a polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1), comprende: ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), ARN de interferencia pequeño (ARNsi); microARN interferente (ARNmi); un ARN temporal pequeño (ARNst); o un ARN de horquilla corto (ARNsh); activación génica inducida por ARN pequeño (ARNa); o, ARN de activación pequeño (ARNsa).

30 En otro caso preferido, el direccionamiento de polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1), p. ej. SEQ ID NO: 3 a 8, modula la expresión o función de estas dianas. En un aspecto, la expresión o función está regulada positivamente en comparación con un control. En otro aspecto preferido, la expresión o función está regulada negativamente en comparación con un control.

35 En otro aspecto preferido, los compuestos antisentido comprenden secuencias expuestas como las SEQ ID NOS: 9 a 66. Estos oligonucleótidos pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, fragmentos más cortos o más largos, enlaces modificados y similares.

En otro caso preferido, las SEQ ID NOS: 9 a 66 comprenden uno o más nucleótidos de ANB.

La tabla 1 muestra oligonucleótidos antisentido ilustrativos útiles en los métodos de la divulgación.

ID de secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO: 9	CUR-0292	T*T*G*G*T*A*T*T*C*A*C*A*A*G
SEQ ID NO: 10	CUR-0293	A*A*A*C*T*G*G*A*A*A*C*C*T*A
SEQ ID NO: 11	CUR-0294	G*A*T*C*T*T*T*A*T*G*A*G*A*A
SEC ID NO: 12	CUR-0295	G*A*T*G*G*A*G*A*A*A*T*T*G*G
SEQ ID NO: 13	CUR-0296	A*G*T*C*T*G*A*T*G*G*A*G*A*A
SEQ ID NO: 14	CUR-0297	T*G*T*T*A*A*G*G*G*A*T*G*T*C

ID de secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO: 15	CUR-0298	A*A*T*C*T*G*C*T*T*T*G*T*T
SEQ ID NO: 16	CUR-0299	A*G*G*G*A*A*T*T*G*A*A*A*T*C
SEC ID NO: 17	CUR-0300	T*A*A*G*G*C*A*A*G*A*T*T*T*C
SEQ ID NO:18	CUR-0301	T*A*A*A*T*G*G*A*G*T*T*A*A*G
SEC ID NO:19	CUR-0302	T*T*A*T*T*T*A*T*A*G*C*A*C*A
SEQ ID NO:20	CUR-0303	T*T*G*C*T*T*C*T*G*C*T*T*A*T
SEQ ID NO:21	CUR-0304	A*A*A*A*A*A*A*T*A*T*T*G*C
SEC ID NO:22	CUR-0305	C*A*G*C*C*T*T*A*A*A*A*A*A
SEQ ID NO:23	CUR-0306	T*T*T*T*A*A*A*C*C*T*C*T*C
SEC ID NO:24	CUR-0307	T*A*G*T*T*C*A*G*A*T*T*T*T
SEQ ID NO:25	CUR-0308	A*G*C*A*G*T*T*G*C*T*A*A*A*T
SEQ ID NO:26	CUR-0309	C*T*G*A*G*T*G*C*A*G*C*A*G*C
SEQ ID NO:27	CUR-0245	G*T*C*T*G*A*T*G*G*A*G*A
SEQ ID NO:28	CUR-0736/CUR-0963	+G*+T*C*T*G*A*T*G*G*+A*+G*+A
SEC ID NO:29	CUR-0688	+G*+T*C*T*G*A*T*G*G*A*+G*+A
SEQ ID NO:30	CUR-0740	+G*mU*mC*+T*mG*mA*+T*mG*mG*+A*mG*mA
SEC ID NO:31	CUR-0664	mG*mU*mC*mU*mG*mA*mU*mG*mG*mA*mG*mA
SEC ID NO:32	sirtas_5	ACTGACACCTAATTGTATTACATGAA
SEC ID NO:33	sirtas_6	TGAGCAGCAGTTGCTAAATTAGTTCA
SEC ID NO:34	sirtas_7	TCTACCTACATTATATCATAGCTCCTA
SEQ ID NO:35	CUR-1230	T*T*G*G*T*A*T*T*C*A*C*A*A*G*T*G*A*A*A
SEC ID NO:36	CUR-1231	T*T*G*C*T*A*A*A*T*T*A*G*T*T*C*A*G*A*T
SEQ ID NO:37	CUR-1232	G*C*A*G*C*A*G*C*A*G*T*T*G*C*T*A*A*A*T
SEC ID NO:38	CUR-1233	G*C*A*G*T*T*G*C*T*A*A*A*T*T*A*G*T*T*C
SEQ ID NO:39	CUR-1302	G*C*C*A*T*G*T*T*G*C*C*C*A*G*T*C*C*A*G*T
SEQ ID NO:40	CUR-1304	G*G*G*C*T*C*T*G*C*T*A*C*T*T*A*C*T*T*G*C

ID de secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEC ID NO:41	CUR-1303	C*C*C*A*G*T*C*T*T*C*A*G*C*C*T*T*G*T*C*T
SEQ ID NO:42	CUR-1305	G*G*G*T*C*T*C*T*G*T*C*A*T*A*T*G*T*T*C*T*T
SEC ID NO:43	CUR-1264	T*T*C*C*T*A*C*C*T*T*C*C*C*T*C*C*A*T*A
SEC ID NO:44	CUR-1265	A*T*T*C*C*T*A*C*C*T*T*C*C*C*T*C*C*A*T
SEQ ID NO:45	CUR-1266	C*C*T*T*A*G*G*G*T*T*G*C*A*G*C*T*A*A*T*T
SEC ID NO:46	CUR-1294	A*T*C*C*C*A*G*C*T*A*C*T*C*A*G*G*A*G*G*C
SEC ID NO:47	CUR-1297	T*C*T*G*G*C*T*G*A*G*T*G*C*A*G*T*G*G*C*T
SEC ID NO:48	CUR-1295	C*C*T*G*G*G*A*G*T*T*G*G*A*G*G*T*T*G*C*A
SEC ID NO:49	CUR-1296	C*A*G*A*T*C*C*C*A*T*G*A*A*G*C*C*A*A*G*A*G
SEQ ID NO:50	CUR-1298	C*T*G*A*C*T*G*C*C*A*T*C*G*A*G*A*A*G*T*G*G
SEC ID NO:51	CUR-1381	G*C*C*C*A*T*C*T*G*C*T*T*G*C*T*T*G*A*T
SEC ID NO:52	CUR-1382	A*T*C*C*T*C*A*C*C*A*C*A*G*T*C*T*T*G*T
SEC ID NO:53	CUR-1383	G*C*T*T*A*C*T*T*C*C*T*C*C*T*C*C*C*T*T*T
SEC ID NO:54	CUR-1384	C*C*A*G*G*T*G*A*T*A*G*G*A*G*C*A*G*A*A*C*T
SEQ ID NO:55	CUR-0842	A*C*C*C*T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*C*T*C*T*C*T
SEC ID NO:56	CUR-0843	C*C*A*C*T*C*T*C*C*C*T*T*C*T*G*T*C*C*T*C*T
SEQ ID NO:57	CUR-0844	C*C*T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*C*T*C*T*C*T*C*T
SEQ ID NO:58	CUR-0845	G*T*C*T*G*T*C*C*C*A*T*C*A*T*G*C*C*A*G*G
SEQ ID NO:59	CUR-0846	T*T*T*C*T*G*A*T*C*C*T*G*C*T*G*C*C*T*C*T
SEQ ID NO: 60	CUR-0948	A*C*C*C*T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*C
SEQ ID NO:61	CUR-0949	C*T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*C*T*C
SEQ ID NO:62	CUR-0950	C*T*C*C*T*T*C*C*T*C*C
SEQ ID NO:63	CUR-0951	C*T*T*C*C*T*C*C*C*T*C*T*C*T*C
SEQ ID NO:64	CUR-0952	A*T*C*C*T*G*C*T*G*C*C*T*C*T
SEQ ID NO: 65	CUR-1098	+C*+T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*+C*+T*+C
SEQ ID NO: 66	CUR-1099	+A*+C*C*C*T*C*C*T*T*C*C*T*+C*+C*+C

La modulación de un ácido nucleico diana deseado puede llevarse a cabo de varias maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ARNsi, etc. Las moléculas de ácido nucleico enzimático (por ejemplo, las ribozimas) son moléculas de ácido nucleico capaces de catalizar una o más de diversas reacciones, que incluyen la capacidad para escindir repetidamente otras moléculas de ácidos nucleicos separadas en un modo específico de secuencia de bases de nucleótidos. Tales moléculas de ácido nucleico enzimático se pueden usar, por ejemplo, para

Debido a su especificidad de secuencia, las moléculas de ácido nucleico enzimático que se escinden en trans muestran promesa como agentes terapéuticos para enfermedad humana (Usman & McSwiggen, (1995) *Ann. Rep. Med. Chem.* 30, 285-294; Christoffersen y Marr, (1995) *J. Med. Chem.* 38, 2023-2037). Las moléculas de ácido nucleico enzimático pueden diseñarse para escindir dianas de ARN específicas dentro del fondo del ARN celular. Un acontecimiento de escisión de este tipo hace que el ARNm no sea funcional y anula la expresión de proteínas de ese ARN. De este modo, la síntesis de una proteína asociada a una patología puede inhibirse de forma selectiva.

En general, los ácidos nucleicos enzimáticos con actividad de escisión de ARN actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión de diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y a continuación se une a un ARN diana mediante el apareamiento de bases complementarias, y una vez se une al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de unirse un ácido nucleico enzimático y escindir su ARN diana, se libera de ese ARN para buscar otra diana y poder unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

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

El desarrollo de ribozimas que son óptimas para la actividad catalítica contribuiría significativamente a cualquier estrategia que empleara ribozimas que escinden ARN con el fin de regular la expresión génica. La ribozima de cabeza de martillo, por ejemplo, funciona con una velocidad catalítica (kcat) de aproximadamente 1 min⁻¹ en presencia de concentraciones de saturación (10 mM) de cofactor de Mg²⁺. Se ha demostrado que una ribozima de «ligasa de ARN» artificial cataliza la reacción de automodificación correspondiente con una velocidad de aproximadamente 100 min⁻¹. Además, se sabe que determinadas ribozimas de cabeza de martillo modificadas que tienen grupos de unión al sustrato hechos de ADN catalizan la escisión de ARN con múltiples velocidades de renovación que se aproximan a 100 min⁻¹. Finalmente, la sustitución de un resto específico dentro del núcleo catalítico de la cabeza de martillo con determinados análogos de nucleótido proporciona ribozimas modificadas que muestran una mejora de hasta 10 veces en la velocidad catalítica. Estos hallazgos demuestran que las ribozimas pueden promover transformaciones químicas con velocidades catalíticas que son significativamente superiores a aquellas mostradas *in vitro* por la mayoría de las ribozimas naturales de autoescisión. Entonces es posible que las estructuras de ciertas ribozimas que se auto-escinden puedan optimizarse para dar la máxima actividad catalítica, o que puedan prepararse motivos de ARN completamente nuevos que muestran velocidades significativamente más rápidas para la escisión de fosfodiéster de ARN.

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

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

El ARN de interferencia (ARNi) se ha convertido en una poderosa herramienta para modular la expresión génica en mamíferos y células de mamífero. Este enfoque requiere el suministro de ARN de interferencia pequeño (ARNsi) bien como el propio ARN o bien como ADN, usando un plásmido de expresión o virus y la secuencia codificante para ARN de horquilla corto que se procesa a ARNsi. Este sistema permite el transporte eficaz de los pre-RNasi al citoplasma donde son activos y permiten el uso de promotores regulados y específicos de tejido para la expresión génica.

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

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

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

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

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

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

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

En un aspecto preferido, la administración de al menos un oligonucleótido dirigido a uno o más polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) evita o trata enfermedades asociadas con la expresión o función anormal de los polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) y productos codificados de los mismos, u otras enfermedades relacionadas. Ejemplos de enfermedades que se pueden tratar con los oligonucleótidos antisentido comprenden: cáncer (p. ej., cáncer de mama, cáncer colorrectal, CCL, CML, cáncer de próstata), una enfermedad o trastorno neurodegenerativa (p. ej., enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS), Esclerosis Múltiple y trastornos causados por agregación de poliglutamina); enfermedad del músculo esquelético (p. ej., distrofia muscular de Duchene, atrofia muscular esquelética, distrofia de Becker o distrofia miotónica); una enfermedad metabólica (p. ej., resistencia a la insulina, diabetes, obesidad, intolerancia a la glucosa, colesterol en sangre elevado, hiperglucemia, dislipidemia e hiperlipidemia); diabetes de inicio en adulto, nefropatía diabética, neuropatía (p. ej., neuropatía sensorial, neuropatía autonómica, neuropatía motora, retinopatía); enfermedad ósea (p. ej., osteoporosis), una enfermedad sanguínea (p. ej., una leucemia); enfermedad hepática (p. ej., debida al abuso del alcohol o hepatitis); obesidad; resorción ósea, degeneración macular asociada a la edad, demencia asociada al SIDA, ALS, Palsy de Bell, aterosclerosis, una enfermedad cardíaca (p. ej., disritmias cardíacas, fallo cardíaco congestivo crónico, infarto isquémico, enfermedad de arteria coronaria y cardiomiopatía), enfermedad crónicamente degenerativa (p. ej., enfermedad del músculo cardíaco), fallo renal crónico, diabetes de tipo 2, ulceración, catarata, presbiopia, glomerulonefritis, síndrome de Guillan-Barre, infarto hemorrágico, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria de bowel, SLE, enfermedad de Crohn, osteoartritis, osteoporosis, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD), neumonía, envejecimiento de la piel, incontinencia urinaria, una enfermedad o trastorno asociado con la disfunción mitocondrial (p. ej., miopatía mitocondrial, encefalopatía, enfermedad de Leber, cefalopatía de Leigh, enfermedad, enfermedad de Pearson, acidosis láctica, encefalopatía mitocondrial, acidosis láctica y síntomas como los síntomas de infarto (MELAS) etc.) y una enfermedad o trastorno asociado con muerte celular neuronal, envejecimiento u otra afección caracterizada por pérdida celular no deseada.

En aspectos de la presente divulgación, se proporcionan regímenes terapéuticos y/o cosméticos y tratamientos adaptados relacionados a sujetos que requieren tratamientos de la piel o en riesgo de desarrollar afecciones para las que requerirán tratamientos para la piel. El diagnóstico se puede hacer, p. ej., en función del estado del SIRT1 del sujeto. Los niveles de expresión de SIRT1 de un paciente en un tejido dado tal como la piel se pueden determinar por métodos conocidos por los expertos en la técnica y descritos en otra parte en el presente documento, p. ej., analizando tejido usando PCR o métodos de detección basados en anticuerpos.

Un aspecto preferido de la presente divulgación proporciona una composición para el tratamiento de la piel y/o una aplicación cosmética que comprende oligonucleótidos antisentido de SIRT1, p. ej., para regular en sentido ascendente la expresión de SIRT1 en la piel. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido se exponen como las SEQ ID NO: 3 a 66. La patente de EE.UU. No. 7,544,497, "Compositions for manipulating the lifespan and stress response of cells and organisms," describe el uso cosmético potencia para agentes que modulan la actividad de SIRT1 reduciendo la K_m de la proteína SIRT1 para su sustrato. En algunos aspectos, las células se tratan in vivo con los oligonucleótidos de la presente divulgación, para aumentar la esperanza de vida celular o prevenir la apoptosis. Por ejemplo, la piel puede protegerse del envejecimiento, p. ej., el desarrollo de arrugas, tratando la piel, p. ej., células epiteliales, como se describe en el presente documento. En un aspecto ilustrativo, la piel se pone en contacto con una composición farmacéutica o cosmética que comprende un compuesto antisentido SIRT1 como se describe en el presente documento. Lesiones cutáneas ilustrativas o afecciones de la piel incluyen trastornos o enfermedades asociadas con o causadas por inflamación, daño solar o envejecimiento natural. Por ejemplo, las composiciones encuentran utilidad en la prevención o tratamiento de dermatitis de contacto (incluyendo dermatitis de contacto irritante y dermatitis de contacto alérgica), dermatitis atópica (también conocida como eccema alérgico), queratosis actínica, trastornos de queratinización (incluyendo eczema), enfermedades de epidermolisis bullosa (incluyendo pénfigo), dermatitis exfoliativa, dermatitis seborreica, eritemas (incluyendo eritema multiforme y eritema nodoso), daño causado por el sol u otras fuentes de luz, lupus eritematoso discoide, dermatomiositis, cáncer de piel y efectos del envejecimiento natural.

Se ha informado que SIRT1 interfiere con la señalización del receptor de andrógenos inducido por dihidrotestosterona. (Véase, p. ej., Fu, et al., 2006, "Hormonal Control of Androgen Receptor Function through SIRT1," Molecular and Cellular Biology 26(21): 8122-8135.)

En los aspectos de la presente divulgación, una composición que comprende oligonucleótidos antisentido SIRT1, p. ej., para regular al alza la expresión de SIRT1 en el cuero cabelludo e inhibir la señalización del receptor de andrógenos, previniendo así la alopecia androgenética (pérdida de cabello). En aspectos, a un paciente que padece alopecia se le administra una formulación tópica o sistémica.

En un caso, un oligonucleótido antisentido descrito en este documento se incorpora a una formulación tópica que contiene un vehículo tópico que es generalmente adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material conocido en la técnica. El vehículo tópico puede seleccionarse para proporcionar la composición en la forma deseada, por ejemplo, como ungüento, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, solución o similar, y puede estar compuesto de un material de origen natural o de origen sintético. Es preferible que el vehículo seleccionado no afecte adversamente al agente activo u otros componentes de la formulación tópica. Los ejemplos de

vehículos tópicos adecuados para su uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares. Las formulaciones pueden ser ungüentos, lociones, cremas, microemulsiones y geles incoloros e inodoros.

5 Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación se pueden incorporar en ungüentos, que generalmente son preparaciones semisólidas que se basan típicamente en vaselina u otros derivados del petróleo. La base de ungüento específica a usar, como apreciarán los expertos en la técnica, es aquella que proporcionará una administración óptima del fármaco y, preferiblemente, proporcionará otras características deseadas también, por ejemplo, emoliencia o similar. Al igual que con otros portadores o vehículos, una base de pomada debe ser inerte, estable, no irritante y sin
10 sensibilidad. Como se explica en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co.), las bases de ungüentos se pueden agrupar en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases de emulsión; y bases solubles en agua. Las bases oleaginosas para ungüentos incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos del petróleo. Las bases de ungüentos emulsionables, también conocidas como bases de ungüentos absorbentes, contienen poca o nada de agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxiestearina,
15 lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Las bases de ungüentos en emulsión son emulsiones de agua en aceite (W/O) o emulsiones de aceite en agua (O/W) e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de pomada solubles en agua ilustrativas a partir de polietilenglicoles (PEG) de peso molecular variable (véase, p. ej., Remington's, más arriba).

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación se pueden incorporar en lociones, que generalmente son preparaciones para aplicar a la superficie de la piel sin fricción, y son típicamente preparaciones líquidas o semilíquidas en las que partículas sólidas, incluido el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son usualmente suspensiones de sólidos, y pueden comprender una emulsión oleosa líquida del tipo de aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas para tratar grandes áreas corporales, debido a la facilidad de aplicación de una composición más fluida. Generalmente, es necesario que la materia insoluble sea una loción que
20 esté finamente dividida. Las lociones típicamente contendrán agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel, p. ej., metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, o similares. Una formulación de loción ejemplar para usar junto con el presente método contiene propilenglicol mezclado con una vaselina hidrófila tal como la que puede obtenerse con la marca comercial Aquaphor^{sup}.RTM de Beiersdorf, Inc. (Norwalk, Conn.).

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación se pueden incorporar en cremas, que generalmente son emulsiones viscosas líquidas o semisólidas, ya sea de aceite en agua o agua en aceite. Las bases de crema son lavables con agua, y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa está generalmente compuesta por vaselina y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico; la fase acuosa usualmente, aunque no necesariamente, excede la fase oleosa en volumen, y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una
30 formulación en crema, como se explica en Remington's, más arriba, es generalmente un tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación se pueden incorporar en microemulsiones, que generalmente son estables termodinámicamente, dispersiones isotópicamente claras de dos líquidos inmiscibles, tales como aceite y agua, estabilizados por una película interfacial de moléculas tensioactivas (Encyclopedia of Pharmaceutical
40 Technology (Nueva York: Marcel Dekker, 1992), volumen 9. Para la preparación de microemulsiones, se necesitan un tensioactivo (emulsionante), cotensioactivo (coemulsionante), una fase oleosa y una fase acuosa. Los tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo que sea útil en la preparación de emulsiones, por ejemplo, emulsionantes que se usan típicamente en la preparación de cremas. El cotensioactivo (o "coemulsionante") generalmente se selecciona del grupo de derivados de poliglicerol, derivados de glicerol y alcoholes grasos. Las combinaciones preferidas de emulsionante/coemulsionante se seleccionan generalmente, aunque no necesariamente, del grupo que consiste en monoestearato de glicerilo y estearato de polioxietileno, palmitoestearato de polietilenglicol y etilenglicol, así como triglicéricos caprílicos y cápricos y macrogoliglicéridos oleosos. La fase acuosa no solo incluye agua sino también, típicamente, amortiguadores, glucosa, propilenglicol, polietilenglicoles, preferentemente polietilenglicoles de bajo peso molecular (p. ej., PEG 300 y PEG 400) y/o glicerol y similares, mientras que la fase oleosa generalmente
45 comprende, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos, aceites vegetales modificados, aceites de silicona, mezclas de mono-, di- y triglicéridos, mono- y diésteres de PEG (p. ej., macrogol glicéridos oleosos), etc.

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación se pueden incorporar en formulaciones de gel, que generalmente son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones formadas por partículas inorgánicas pequeñas (sistemas de dos fases) o moléculas orgánicas grandes distribuidas de forma sustancialmente uniforme por todo un líquido transportador (geles de fase única). Los geles monofásicos se pueden preparar, por ejemplo, combinando el agente activo, un líquido portador y un agente gelificante adecuado tal como tragacanto (del 2 al 5%), alginato sódico (al 2-10%), gelatina (al 2-15%), metilcelulosa (al 3-5%), carboximetilcelulosa sódica (al 2-5%), carbómero (al 0,3-5%) o alcohol polivinílico (al 10-20%) juntos y en mezcla hasta que se produce un producto semisólido característico. Otros agentes gelificantes adecuados incluyen metilhidroxilcelulosa, polioxietileno-polioxipropileno, hidroxietilcelulosa y gelatina. Aunque los geles comúnmente emplean un líquido portador acuoso, también se pueden usar alcoholes y aceites como el líquido transportador.
60

Se pueden incluir diversos aditivos, conocidos por los expertos en la materia, en las formulaciones, p. ej., formulaciones tópicas. Los ejemplos de aditivos incluyen, pero no se limitan a, solubilizantes, potenciadores de la permeación de la piel, opacificantes, conservantes (p. ej., antioxidantes), agentes gelificantes, agentes tamponantes, tensioactivos (particularmente tensioactivos no iónicos y anfóteros), emulsionantes, emolientes, agentes espesantes, estabilizadores, humectantes, colorantes, fragancias, y similares. La inclusión de solubilizantes y/o potenciadores de la permeación de la piel es particularmente preferida, junto con emulsionantes, emolientes y conservantes. Una formulación tópica óptima comprende aproximadamente del 2% en peso al 60% en peso, preferiblemente del 2% en peso al 50% en peso de solubilizador y/o potenciador de la permeación de la piel; del 2% en peso al 50% en peso, preferiblemente del 2% en peso al 20% en peso de emulsionantes; del 2% en peso al 20% en peso de emoliente; y del 0,01 al 0,2% en peso de conservante, constituyendo el agente activo y el vehículo (p. ej., agua) el resto de la formulación.

Un potenciador de la permeación de la piel sirve para facilitar el paso de niveles terapéuticos de agente activo para pasar a través de un área de tamaño razonable de piel intacta. Los potenciadores adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo: alcoholes inferiores tales como metanol etanol y 2-propanol; alquil metil sulfóxidos tales como sulfóxido de dimetilo (DMSO) decilmetilsulfóxido (MSO C10) y sulfóxido de tetradecilmetilo; pirrolidonas tales como 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona y N-(-hidroxietil)pirrolidona; urea; N,N-dietil-m-toluamida; alcanodiolos C2-C6; diversos disolventes tales como dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA) y alcohol tetrahidrofurfurílico; y las azacicloheptan-2-onas sustituidas en 1, particularmente 1-n-dodecilciclazacicloheptan-2-ona (laurocapram; disponible bajo la marca registrada Azone.sup.RTM de Whitby Research Incorporated, Richmond, Va.).

Los ejemplos de solubilizantes incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: éteres hidrófilos tales como dietilenglicol monoetil éter (etoxidiglicol, disponible comercialmente como Transcutol.sup.RTM) y oleato de dietilenglicol monoetil éter (disponible comercialmente como Soficutol.sup.RTM); derivados de aceite de ricino de polietileno tales como aceite de ricino polioxi 35, aceite de ricino hidrogenado polioxi 40, etc.; polietilenglicol, particularmente polietilenglicoles de menor peso molecular tales como PEG 300 y PEG 400, y derivados de polietilenglicol tales como glicéridos caprílicos/cápricos PEG-8 (disponibles comercialmente como Labrasol.sup.RTM); alquilmetilsulfóxidos tales como DMSO; pirrolidonas tales como 2-pirrolidona y N-metil-2-pirrolidona; y ADM. Muchos solubilizantes también pueden actuar como potenciadores de la absorción. Se puede incorporar un único solubilizante en la formulación, o se puede incorporar una mezcla de solubilizantes en la misma.

Los emulsionantes y coemulsionantes adecuados incluyen, sin limitación, los emulsionantes y coemulsionantes descritos con respecto a las formulaciones en microemulsión. Los emolientes incluyen, por ejemplo, propilenglicol, glicerol, miristato de isopropilo, propionato de polipropilenglicol-2 (PPG-2) éter miristílico y similares.

Otros agentes activos también se pueden incluir en formulaciones, por ejemplo, otros agentes antiinflamatorios, analgésicos, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, antibióticos, vitaminas, antioxidantes y bloqueadores solares que se encuentran comúnmente en formulaciones de protección solar incluyendo, pero no se limitan a, antranilatos, benzofenonas (particularmente benzofenona-3), derivados de alcanfor, cinamatos (por ejemplo, metoxicinamato de octilo), metanos de dibenzoilo (por ejemplo, butil metoxidibenzoil metano), ácido p-aminobenzoico (PABA) y derivados de los mismos, y salicilatos (p. ej., salicilato de octilo).

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

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

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos antisentido, tales como, por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico expuestas en la SEQ ID NOS: 9 a 66 comprenden una o más sustituciones o modificaciones. En un aspecto, los nucleótidos están sustituidos con ácidos nucleicos bloqueados (ANB).

En otro aspecto preferido, los oligonucleótidos se dirigen a una o más regiones de las moléculas de ácido nucleico que son sentido y/o antisentido de las secuencias codificantes y/o no codificantes asociadas con SIRT1 y las secuencias expuestas como las SEQ ID NO: 1 a 8. Los oligonucleótidos también se dirigen a las regiones solapantes de las SEQ ID NOS: 1 a 8.

Determinados oligonucleótidos preferidos de esta divulgación son los oligonucleótidos quiméricos. «Oligonucleótidos quiméricos» o «quimeras», en el contexto de esta divulgación, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta por al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos típicamente contienen al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, una mayor resistencia a nucleasas, una mayor captación en células, una mayor afinidad de unión por la diana) y una región que es un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por lo tanto, produce la escisión de la diana de ARN, mejorando de este modo en gran medida la eficiencia de la modulación antisentido de la expresión génica. En consecuencia, con frecuencia pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN se puede detectar de forma rutinaria mediante electroforesis con gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácido nucleico asociadas conocidas en la técnica. En un aspecto preferido, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de unión de la diana, y, normalmente, una región que actúa de sustrato para ARNasa H. La afinidad de un oligonucleótido por su diana (en este caso, un ácido nucleico que codifica ras) se determina rutinariamente midiendo la T_m de un par de oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y la diana; la disociación se detecta espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea la T_m , mayor será la afinidad del oligonucleótido por la diana.

Se pueden formar compuestos antisentido quiméricos de la divulgación como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gapmeros. Las patentes representativas de EE.UU. que muestran la preparación de tales estructura híbridas comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nos. 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922.

En otro aspecto preferido, la región del oligonucleótido que se modifica comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, de la forma más preferente un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-fluoro. En otros aspectos preferidos, las modificaciones de ARN incluyen modificaciones de 2'-fluor, 2'-amino y 2'-O-metilo en la ribosa de pirimidinas, restos abásicos o una base invertida en el extremo 3' del ARN. Tales modificaciones se incorporan habitualmente en los oligonucleótidos y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una mayor T_m (es decir, mayor afinidad de unión a diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos frente a una diana dada. El efecto de tal afinidad aumentada es mejorar en gran medida la inhibición por oligonucleótidos de ARNi de la expresión génica. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de los dúplex de ARN:ADN; por lo tanto, la activación de esta enzima produce la escisión del ARN diana, y así puede mejorar en gran medida la eficiencia de inhibición de ARNi. La escisión del ARN diana puede demostrarse habitualmente por electroforesis en gel. En otro aspecto preferido, el oligonucleótido quimérico también se modifica para mejorar la resistencia a nucleasas. Las células contienen diversas exo y endonucleasas que pueden degradar ácidos nucleicos. Se ha demostrado que varias modificaciones de nucleótidos y nucleósidos hacen que el oligonucleótido donde se incorporan sea más resistente a la digestión por nucleasa que el oligodesoxinucleótido nativo. La resistencia a nucleasas se mide habitualmente incubando oligonucleótidos con extractos celulares o soluciones de nucleasa aisladas y midiendo el grado de oligonucleótido intacto que queda con el tiempo, generalmente por electroforesis en gel. Los oligonucleótidos que se han modificado para mejorar su resistencia a nucleasas sobreviven intactos durante más tiempo que los oligonucleótidos sin modificar. Se ha demostrado que diversas modificaciones de oligonucleótidos mejoran o confieren resistencia a nucleasas. Los oligonucleótidos que contienen al menos una modificación de fosforotioato son actualmente más preferidos. En algunos aspectos, las modificaciones de oligonucleótidos que mejoran la afinidad de unión a diana son, también, independientemente, capaces de mejorar la resistencia a nucleasas. Algunas modificaciones deseables pueden encontrarse en De Mesmaeker et al (1995) Acc. Chem. Res., 28:366-374.

Ejemplos específicos de algunos oligonucleótidos preferidos concebidos por esta divulgación incluyen aquellos que comprenden estructuras modificadas, por ejemplo, fosforotioatos, fosfotriésteres, metilfosfonatos, enlaces entre azúcares de alquilo o cicloalquilo de cadena corta o enlaces entre azúcares heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Los más preferidos son oligonucleótidos con esqueletos de fosforotioato y aquellos con esqueletos de heteroátomo, particularmente esqueletos de $\text{CH}_2\text{--NH--O--CH}_2$, $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--O--CH}_2$ [conocido como un esqueleto de metilen(metilimino) o MMI], $\text{CH}_2\text{--O--N(CH}_3\text{)--CH}_2$, $\text{CH}_2\text{--N(CH}_3\text{)--N(CH}_3\text{)--CH}_2$ y $\text{O--N(CH}_3\text{)--CH}_2\text{--CH}_2$, donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como O--P--O--CH_2 . Las estructuras de amida descritas por De Mesmaeker et al. (1995) Acc. Chem. Res. 28:366-374 también se prefieren. También se prefieren oligonucleótidos que tienen esqueletos de morfolino (Summerton y Weller, Patente de EE.UU. No. 5,034,506). En otros aspectos preferidos, tal como la estructura de ácido nucleico peptídico (ANP), la estructura de fosfodiéster del oligonucleótido se sustituye por una estructura de poliamida, uniéndose los nucleótidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la estructura de poliamida (Nielsen et al. (1991) Science 254, 1497). Los oligonucleótidos también pueden comprender uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃, OCH₃, O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂ o O(CH₂)_n CH₃ donde n es de 1 a aproximadamente 10; alquilo inferior de C₁ a C₁₀, alcoxi, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; sililo sustituido; un grupo de

escisión de ARN; un grupo reportero; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido; o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi [2'-O-CH₂ CH₂ OCH₃, también conocida como 2'-O-(2-metoxietil)] (Martin et al., (1995) *Helv. Chim. Acta*, 78, 486). Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH₃), 2'-propoxi (2'-OCH₂ CH₂CH₃) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' y la posición 5' del nucleótido del terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como ciclobutilos en lugar del grupo pentofuranosilo.

Los oligonucleótidos también pueden incluir, además o como alternativa, modificaciones o sustituciones de nucleobases (con frecuencia denominadas en la técnica simplemente «base»). Tal como se usa en el presente documento, nucleótidos "no modificados" o "naturales" incluyen adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Los nucleótidos modificados incluyen nucleótidos encontrados solo poco frecuentemente o transitoriamente en ácidos nucleicos naturales, p. ej., hipoxantina, 6-metiladenina, 5-Me-pirimidinas, particularmente 5-metilcitosina (también denominada 5-metil-2'-desoxicitosina y frecuentemente denominada en la técnica 5-Me-C), 5-hidroximetilcitosina (HMC), glicosil HMC y gentobiosil HMC, además de nucleótidos sintéticos, p. ej., 2-aminoadenina, 2-(metilamino)adenina, 2-(imidazolilalquil)adenina, 2-(aminoalquilamino)adenina u otras alquiladeninas heterosustituidas, 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-bromouracilo, 5-hidroximetiluracilo, 8-azaguanina, 7-deazaguanina, N₆ (6-aminohehil)adenina y 2,6-diaminopurina. Kornberg, A., *DNA Replication*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1980, pp75-77; Gebeyehu, G., (1987) et al. *Nucl. Acids Res.* 15:4513). Se puede incluir una base "universal" conocida en la técnica, p. ej., inosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-Me-C incrementan la estabilidad dúplex del ácido nucleico alrededor de 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., en Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) y actualmente son las sustituciones base preferidas.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen, pero no se limitan a, restos de lípidos tales como un resto de colesterol, un resto de colesterilo (Letsinger et al., (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6553), ácido cólico (Manoharan et al., (1994) *Bioorg. Med. Chem. Let.* 4, 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al. (1992) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660, 306; Manoharan et al. (1993) *Bioorg. Med. Chem. Let.* 3, 2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., (1992) *Nucl. Acids Res.* 20, 533), una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al. *EMBO J.* 1991, 10, 111; Kabanov et al. (1990) *FEBS Lett.* 259, 327; Svinarchuk et al. (1993) *Biochimie* 75, 49), un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al. (1995) *Tetrahedron Lett.* 36, 3651; Shea et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18, 3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al. (1995) *Nucleosides & Nucleotides*, 14, 969), o ácido adamantano acético (Manoharan et al. (1995) *Tetrahedron Lett.* 36, 3651). Los oligonucleótidos que comprenden restos lipófilos, y procedimientos para preparar dichos oligonucleótidos, son conocidos en la técnica, por ejemplo, las pat. de EE.UU. Nos. 5,138,045, 5,218,105 y 5,459,255.

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

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

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta divulgación pueden prepararse de manera práctica y habitual mediante la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para dichas síntesis es comercializado por varios proveedores que incluyen Applied Biosystems. También se puede emplear cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está bien dentro de los talentos de un experto en la materia. También es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. También es muy conocido usar técnicas similares y amiditos modificados disponibles en el mercado y productos de vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditos modificados con psoraleno y/o CPG (disponible en Glen Research, Sterling VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados de forma fluorescente, biotinilados u otros oligonucleótidos modificados tales como oligonucleótidos modificados con colesterol.

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

aproximadamente el 60%, lo más preferentemente menos de aproximadamente el 50% de monómeros de ANB y que sus tamaños estén entre aproximadamente 5 y 25 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 12 y 20 nucleótidos.

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

Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores comprenden, pero no se limitan a, 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; y 5,625,050.

Las estructuras de oligonucleótidos modificados preferidas que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos tienen estructuras que se forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos comprenden aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxano; estructuras de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras de formaceto y tioformaceto; estructuras de metilformaceto y tioformaceto; estructuras que contienen alqueno; estructuras de sulfamato; estructuras de metilnimino y metilhidrazino; estructuras de sulfonato y sulfonamida; estructuras de amida; y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtos.

Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. nos. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; y 5,677,439.

En otros miméticos de oligonucleótidos preferidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la estructura, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácido nucleico diana adecuado. Tal compuesto oligomérico, un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (ANP). En compuestos de ANP, la estructura de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por una estructura que contiene amida, en particular una estructura de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte de amida de la estructura. Las patentes representativas de EE.UU. que muestran la preparación de compuestos de ANP comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nos. 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262.

Se puede encontrar información adicional sobre los compuestos de ANP en Nielsen et al., Science, (1991), 254, 1497-1500.

En otro aspecto preferido de la descripción, los oligonucleótidos con estructuras de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras de heteroátomos, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂, se conocen como metileno (metilimino) o estructura MMI, -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂N(CH₃)-N(CH₃)CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- en donde la estructura nativa de fosfodiéster se representa como -O-P-O-CH₂- de la patente de EE. UU. n.º 5,489,677 mencionada anteriormente, y la estructura de amida de la patente de EE. UU. n.º 5,602,240 mencionada anteriormente. También son preferidos los oligonucleótidos que tienen estructuras de morfolino de la patente de EE.UU. 5,034,506 anteriormente referenciada.

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-alquilenilo; O-, S- o N-alquiniilo; o O alquilo-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueniilo y alquiniilo pueden ser alquilo C a CO o alqueniilo y alquiniilo C2 a CO sustituidos o sin sustituir. Se prefieren particularmente O(CH₂)_n OmCH₃, O(CH₂)_n.OCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON(CH₂)_nCH₃)₂ donde n y m pueden ser de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': C a CO, (alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida comprende 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin et al., (1995) Helv. Chim. Acta, 78, 486-504) i.e., un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferida comprende

2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂.

Otras modificaciones preferidas comprenden 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-O CH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en oligonucleótidos enlazados en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas comprenden, pero sin limitación, las patentes de EE.UU. n.º 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514, 785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646, 265; 5,658,873; 5,670,633; y 5,700,920.

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

Además, los nucleótidos comprenden los divulgados en la patente de Estados Unidos n.º 3.687.808, aquellos divulgados en 'The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering', páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch et al., 'Angewandte Chemie, International Edition', 1991, 30, page 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, 'Antisense Research and Applications', páginas 289-302, Crooke, S.T. y Lebleu, B. ea., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la divulgación. Estos comprenden pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y purinas sustituidas en 0-6 que comprenden 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracil y 5-metilcitosina, las sustituciones 5-metilcitosinahan mostrado que aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 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 base preferidas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O-metoxietilo.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas, comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n.º 3,687,808, así como 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; 5,596,091; 5,614,617; 5,750,692, y 5,681,941.

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

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

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. n.º 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.

Descubrimiento de fármacos: Los compuestos de la presente divulgación también pueden aplicarse en las áreas del descubrimiento de fármacos y validación de dianas. La presente divulgación comprende el uso de los compuestos y segmentos diana preferidos identificados en el presente documento en esfuerzos en descubrimiento de fármacos para elucidar las relaciones que existen entre polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) y una patología, fenotipo o afección.

Estos métodos incluyen detectar o modular los polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) que comprenden poner en contacto una muestra, tejido, célula u organismo con los compuestos de la presente divulgación, medir el nivel de ácido nucleico o de proteína de los polinucleótidos de Sirtuina 1 (SIRT1) y/o un criterio de valoración fenotípico o químico relacionado en algún momento después del tratamiento, y opcionalmente comparar el valor medido con una muestra no tratada o muestra tratada con otro compuesto de la divulgación. Estos métodos también pueden realizarse en paralelo o en combinación con otros experimentos para determinar la función de genes desconocidos para el procedimiento de validación de dianas o para determinar la validez de un producto génico particular como diana para el tratamiento o prevención de una enfermedad, afección o fenotipo particular.

Evaluación de la regulación positiva o inhibición de la expresión génica:

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

La expresión de ARN del ácido nucleico exógeno también puede detectarse midiendo una actividad enzimática o una actividad de proteína reportera. Por ejemplo, puede medirse la actividad moduladora antisentido indirectamente como una disminución o aumento en la expresión de ácido nucleico diana como una indicación de que el ácido nucleico exógeno está produciendo el ARN efector. Basándose en la conservación de secuencias, pueden diseñarse cebadores y usarse para amplificar regiones codificantes de los genes diana. Inicialmente, la región codificante más altamente expresada de cada gen puede usarse para construir un gen de control modelo, aunque puede usarse cualquier región codificante o no codificante. Cada gen de control se ensambla insertando cada región de codificación entre una región de codificación informadora y su señal poli(A). Estos plásmidos producirían un ARNm con un gen reportero en la parte aguas arriba del gen y una potencial diana de ARNi en la región no codificante 3'. La efectividad de los oligonucleótidos antisentido individuales se ensayaría por modulación del gen reportero. Los genes reporteros útiles en los métodos de la presente divulgación incluyen acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta-galactosidasa (LacZ), beta glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa

(NOS), octopina sintasa (OCS) y sus derivados. Hay disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a la ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los métodos para determinación de la modulación de un gen reportero son muy conocidos en la técnica, e incluyen, pero no se limitan a, procedimientos fluorimétricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, Clasificación Celular Activada por Fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de la resistencia a antibióticos.

La expresión de la proteína SIRT1 y del ARNm se pueden valorar usando procedimientos conocidos por los expertos en la materia y descritos en otra parte en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse inmunoensayos tales como ELISA para medir los niveles de proteínas. Los anticuerpos SIRT1 para ELISA están disponibles comercialmente, p. ej., en R&D Systems (Minneapolis, MN), Abcam, Cambridge, MA.

En aspectos, la expresión de SIRT1 (p. ej., ARNm o proteína) en una muestra (por ejemplo, células o tejidos in vivo o in vitro) tratada usando un oligonucleótido antisentido de la divulgación se evalúa comparando con la expresión de SIRT1 en una muestra de control. Por ejemplo, la expresión de la proteína o ácido nucleico puede compararse usando procedimientos conocidos para los expertos en la materia con aquella en una muestra tratada con vector simulado o sin tratar. De forma alternativa, puede hacerse una comparación con una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido control (p. ej., uno que tenga una secuencia modificada o diferente) dependiendo de la información deseada. En otro aspecto, una diferencia en la expresión de la proteína SIRT1 o ácido nucleico en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar puede compararse con la diferencia en la expresión de un ácido nucleico diferente (incluyendo cualquier patrón que el investigador considere apropiado, p. ej. un gen de mantenimiento) en una muestra tratada frente a una muestra sin tratar.

Las diferencias observadas pueden expresarse como se desee, p. ej. en forma de proporción o fracción, para su uso en comparación con un control. En unos aspectos, el nivel de ARNm o proteína de SIRT1, en una muestra tratada con un oligonucleótido antisentido de la presente divulgación, aumenta o disminuye entre aproximadamente 1,25 veces a unas 10 veces o más en relación con una muestra sin tratar o una muestra tratada con un ácido nucleico de control. En unos aspectos, el nivel de ARNm de SIRT1 o proteína aumenta o disminuye en al menos aproximadamente 1,25

veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 4,5 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 5,5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 6,5 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 7,5 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 8,5 veces, al menos aproximadamente 9 veces, al menos aproximadamente 9,5 veces, o al menos aproximadamente 10 veces o más.-

Kits, Reactivos de Investigación, Diagnósticos y Agentes Terapéuticos

10 Los compuestos de la presente divulgación pueden utilizarse para diagnósticos, agentes terapéuticos y profilaxis, y como reactivos de investigación y componentes de kits. Además, los oligonucleótidos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con exquisita especificidad, son usados con frecuencia por los expertos en la materia para dilucidar la función de genes particulares o para distinguir entre funciones de diversos miembros de una vía biológica.

15 Para su uso en kits y diagnósticos y en diversos sistemas biológicos, los compuestos de la presente divulgación, tanto solos como en combinación con otros compuestos o agentes terapéuticos, son útiles como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para dilucidar patrones de expresión de una parte o de todo el complemento de genes expresados dentro de células y tejidos.

20 Como se usa en este documento, la expresión «sistema biológico» o «sistema» se define como cualquier organismo, célula, cultivo de célula o tejido que se expresa, o se hace competente para expresar los productos de los genes de Sirtuina 1 (SIRT1). Estos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, animales transgénicos, células, cultivos celulares, tejidos, xenoinjertos, trasplantes y combinaciones de los mismos.

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

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

45 Los compuestos de la divulgación son útiles para la investigación y el diagnóstico, debido a que estos compuestos se hibridan con ácidos nucleicos que codifican Sirtuina 1 (SIRT1). Por ejemplo, los oligonucleótidos que hibridan con dicha eficiencia y en dichas condiciones que se han divulgado en el presente documento como moduladores eficaces de Sirtuina 1 (SIRT1) son cebadores o sondas eficaces en condiciones que favorecen la amplificación génica o detección, respectivamente. Estos cebadores y sondas son útiles en procedimientos que requieren la detección específica de moléculas de ácidos nucleicos que codifican Sirtuina 1 (SIRT1) y en la amplificación de dichas moléculas de ácidos nucleicos para la detección o para su uso en estudios adicionales de Sirtuina 1 (SIRT1). La hibridación de los oligonucleótidos antisentido, en particular los cebadores y las sondas, de la descripción con un ácido nucleico que codifica Sirtuina 1 (SIRT1) puede detectarse por medios conocidos en la técnica. Dichos medios pueden incluir la conjugación de una enzima con el oligonucleótido, el radiomarcado del oligonucleótido o cualquier otro medio de detección adecuado. También pueden prepararse kits que usan dichos medios de detección para detectar el nivel de Sirtuina 1 (SIRT1) en una muestra.

55 La especificidad y sensibilidad del antisentido también es aprovechada por los expertos en la materia para usos terapéuticos. Se han empleado compuestos antisentido como restos terapéuticos en el tratamiento de patologías en animales, que incluyen seres humanos. Los fármacos de oligonucleótidos antisentido se han administrado con seguridad y de forma eficaz a seres humanos y numerosos ensayos clínicos están actualmente en marcha. Así, se establece que los compuestos antisentido pueden ser modalidades terapéuticas útiles que pueden configurarse para

ser útiles en regímenes de tratamiento para el tratamiento de células, tejidos y animales, especialmente seres humanos.

Para agentes terapéuticos, un animal, preferiblemente un ser humano, que se sospecha o tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse modulando la expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación. Por ejemplo, en un aspecto no limitante, los métodos comprenden la etapa de administrar al animal que necesita tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva del modulador de Sirtuina 1 (SIRT1). Los moduladores de Sirtuina 1 (SIRT1) de la presente divulgación modulan de manera efectiva la actividad de Sirtuina 1 (SIRT1) o modulan la expresión de la proteína Sirtuina 1 (SIRT1). En un aspecto, la actividad o expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) en un animal se inhibe aproximadamente el 10% en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) en un animal se inhibe aproximadamente el 30%. Más preferiblemente, la actividad o expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) en un animal se inhibe en un 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de Sirtuina 1 (SIRT1) en al menos el 10%, al menos el 50%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100% en comparación con un control.

En un aspecto, la actividad o expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) y/o en un animal se incrementa en aproximadamente un 10% en comparación con un control. Preferiblemente, la actividad o expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) en un animal se aumenta en aproximadamente 30%. Más preferiblemente, la actividad o expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) en un animal se aumenta en 50% o más. De este modo, los compuestos oligoméricos modulan la expresión del ARNm de Sirtuina 1 (SIRT1) en al menos el 10%, al menos el 50%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100% en comparación con un control.

Por ejemplo, la reducción de la expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) puede medirse en suero, sangre, tejido adiposo, hígado o cualquier otro fluido corporal, tejido u órgano del animal. Preferiblemente, las células contenidas dentro de dichos fluidos, tejidos u órganos que se analizan contienen una molécula de ácido nucleico que codifica péptidos Sirtuina 1 (SIRT1) y/o la propia proteína Sirtuina 1 (SIRT1).

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

Conjugados

Otra modificación de los oligonucleótidos de la divulgación implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular, o la captación celular del oligonucleótido. Estos restos o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos de manera covalente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la divulgación incluyen intercaladores, moléculas reporteras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros, y grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta descripción, incluyen grupos que mejoran la captación, mejoran la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico diana. Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta divulgación incluyen grupos que mejoran la captación, la distribución, el metabolismo o la excreción de los compuestos de la presente divulgación. Grupos conjugados representativos se divulgan en la solicitud de patente internacional No. PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y la Patente de EE.UU. 6,287,860.

Los restos conjugados incluyen, pero no se limitan a, restos de lípidos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, p. ej., hexil-5-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p. ej., restos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano acético, un resto palmitilo, o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicoolesterol. Los oligonucleótidos de la divulgación también pueden conjugarse con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótidos comprenden, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. Nos. 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241,

5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941.

Formulaciones

5 Los compuestos de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otra manera a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales formulaciones que asisten a la ingesta, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. Nos. 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,165; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 10 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; y 5,595,756.

Aunque los oligonucleótidos antisentido no necesitan administrarse en el contexto de un vector con el fin de modular la expresión y/o función de una diana, los aspectos de la divulgación se refieren a constructos de vectores de expresión para la expresión de oligonucleótidos antisentido, que comprenden promotores, secuencias de genes promotores 15 híbridos y poseen una fuerte actividad promotora constitutiva, o una actividad promotora que puede inducirse en el caso deseado.

En un aspecto, la práctica de la divulgación implica administrar al menos uno de los oligonucleótidos antisentido anteriores con un sistema de suministro de ácidos nucleicos adecuado. En un aspecto, ese sistema incluye un vector no viral enlazado operativamente al polinucleótido. Los ejemplos de tales vectores no virales incluyen el oligonucleótido solo (por ejemplo, uno cualquiera o más de las SEQ ID NOS: 9 a 66) o en combinación con una formulación adecuada 20 de proteína, polisacárido o lípido.

Los sistemas de suministro de ácidos nucleicos adecuados adicionales incluyen un vector viral, típicamente la secuencia de al menos uno de un adenovirus, un virus asociado a adenovirus (AAV), un adenovirus dependiente de auxiliar, un retrovirus, o un complejo de virus hemaglutinante de Japón-liposoma (HVJ). Preferiblemente, el vector viral 25 comprende un promotor eucariota fuerte enlazado operativamente al polinucleótido, p. ej., un promotor del citomegalovirus (CMV).

Los vectores preferidos adicionales incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Los vectores retrovirales incluyen virus de la leucemia murina de Moloney y virus basados en el VIH. Un vector viral basado en el VIH preferido comprende al menos dos vectores donde los genes gag y pol son de un genoma del VIH y el gen env 30 es de otro virus. Se prefieren los vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de pox tales como vectores de ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como un vector del virus del herpes simple I (HSV) [Geller, A.I. et al., (1995) J. Neurochem, 64: 487; Lim, F., et al., en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A.I. et al., (1993) Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A.:90 7603; Geller, A.I., et al., (1990) Proc Natl. Acad. Sci USA: 87:1149], Adenovirus Vectors (LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); 35 Davidson, et al., (1993) Nat. Genet. 3: 219; Yang, et al., (1995) J. Virol. 69: 2004) y Adeno-associated Virus Vectors (Kaplitt, M.G., et al., (1994) Nat. Genet. 8:148).

Los compuestos antisentido de la descripción abarcan cualquier sal, éster o sal de tales ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, que incluye un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o resto del mismo.

40 La expresión «sales farmacéuticamente aceptables» se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la divulgación: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. Para los oligonucleótidos, ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la pat. de EE.UU. No. 6,287,860.

La presente divulgación también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido de la divulgación. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden administrarse de 45 varias formas dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que va a tratarse. La administración puede ser tópica (tal como a las membranas de mucosas, lo que incluye la administración vaginal y rectal), pulmonar, p. ej., mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye mediante un nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y trasdérmica; oral o parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o la infusión 50 intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal (p. ej., intratecal o intraventricular).

Para el tratamiento de los tejidos en el sistema nervioso central, la administración puede realizarse, p. ej. por inyección o infusión en el líquido cefalorraquídeo. La administración de ARN antisentido en el líquido cefalorraquídeo se describe, p. ej., en la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. No. 2007/0117772, "Methods for slowing familial ALS disease progression".

55 Cuando se pretende que el oligonucleótido antisentido de la presente divulgación se administre a células en el sistema nervioso central, la administración puede ser con uno o más agentes capaces de promover la penetración del oligonucleótido antisentido objeto a través de la barrera hematoencefálica. La inyección puede realizarse, p. ej., en la

corteza entorrinal o en el hipocampo. La aplicación de factores neurotróficos mediante la administración de un vector adenovirus en las neuronas motoras del tejido muscular se describe en, p. ej., la patente de EE.UU. No. 6,632,427, "Adenoviral-vector-mediated gene transfer into medullary motor neurons". La aplicación de vectores directamente al cerebro, p. ej., el cuerpo estriado, el tálamo, el hipocampo, o la sustancia negra es conocida en la técnica y se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. No. 6,756,523, "Adenovirus vectors for the transfer of foreign genes into cells of the central nervous system particularly in brain". La administración puede ser rápida como por inyección o realizarse a lo largo de un período de tiempo como por infusión lenta o administración de formulaciones de liberación lenta.

Los oligonucleótidos antisentido sujeto también pueden unirse o conjugarse con agentes que proporcionen unas propiedades farmacéuticas o farmacodinámicas deseables. Por ejemplo, el oligonucleótido antisentido puede acoplarse a cualquier sustancia, conocida en la técnica por favorecer la penetración o el transporte a través de la barrera hematoencefálica, como un anticuerpo contra el receptor de la transferrina, y administrarse por inyección intravenosa. El compuesto antisentido puede unirse a un vector viral, por ejemplo, que hace que el compuesto antisentido resulte más eficaz y/o aumente el transporte del compuesto antisentido a través de la barrera hematoencefálica. La alteración de la barrera hematoencefálica osmótica también puede llevarse a cabo mediante perfusión, p. ej. de azúcares incluyendo, pero sin limitarse a, mesoeritritol, xilitol, D(+) galactosa, D(+) lactosa, D(+) xilosa, dulcitol, mioinositol, L(-) fructosa, D(-) manitol, D(+) glucosa, D(+) arabinosa, D(-) arabinosa, celobiosa, D(+) maltosa, D(+) rafinosa, L(+) ramnosa, D(+) melibiosa, D(-) ribosa, adonitol, D(+) arabitól, L(-) arabitól, D(+) fucosa, L(-) fucosa, D(-) lixosa, L(+) lixosa y L(-) lixosa o aminoácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, glutamina, lisina, arginina, asparagina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, valina, tirosina y taurina. Los métodos y materiales para potenciar la penetración de la barrera hematoencefálica se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. No.4,866,042, "Method for the delivery of genetic material across the blood brain barrier," 6,294,520, "Material for passage through the blood-brain barrier" y 6,936,589, "Parenteral delivery systems".

Los compuestos antisentido sujetos también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Por ejemplo, pueden incluirse lípidos catiónicos en la formulación para facilitar la captación de oligonucleótidos. Una de dichas composiciones que se ha demostrado que facilita la absorción es LIPOFECTIN (disponible en GIBCO-BRL, Bethesda, MD).

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

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

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

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

Las emulsiones normalmente son sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 μm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente bien como una solución en la fase acuosa, la fase oleosa o bien el mismo como una fase independiente. Las microemulsiones están incluidas como un aspecto de la presente divulgación. Las emulsiones y sus usos son muy conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. 6,287,860.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen formulaciones liposomales. Como se usa en la presente divulgación, el término «liposoma» significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas. Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada por

un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición que va a suministrarse. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que se cree que interactúan con moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. Se cree que los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente atrapan el ADN en vez de formar complejos con él. Se han usado tanto liposomas catiónicos como no catiónicos para suministrar ADN a las células.

Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", una expresión que, tal como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados. Cuando se incorporan en liposomas, estos lípidos especializados producen liposomas con vidas en circulación mejoradas con respecto a los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos donde parte de la parte lipídica formadora de vesícula del liposoma comprende uno o más glucolípidos o se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 6,287,860.

Las formulaciones y composiciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender tensioactivos. El uso de tensioactivos en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones es bien conocido en la técnica. Los tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la pat. de EE.UU. No. 6,287,860.

En un aspecto, la presente divulgación emplea diversos potenciadores de la penetración para efectuar el suministro eficiente de ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también mejoran la permeabilidad de los fármacos lipófilos. Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes. Los potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la pat. de EE.UU. 6,287,860.

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

Las formulaciones preferidas para la administración tópica incluyen aquellas donde los oligonucleótidos de la divulgación están en mezcla con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (p. ej., dioleoil-fosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (p. ej., dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (p. ej., dioleiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoil-fosfatidiletanolamina DOTMA).

Para la administración tópica u otra, los oligonucleótidos de la divulgación pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los oligonucleótidos pueden formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 6,287,860.

Las composiciones y formulaciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas donde los oligonucleótidos de la divulgación se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Ácidos biliares/sales y ácidos grasos preferidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 6,287,860.

También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen éter polioxietilen-9-laurílico, éter polioxietilen-20-cetílico. Los oligonucleótidos de la divulgación pueden suministrarse por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o en complejos para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de oligonucleótidos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. No. 6,287,860.

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

Determinados aspectos de la divulgación proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, aunque no se limitan a, fármacos quimioterapéuticos para el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, biscloroetil-nitrosurea, busulfano,

- mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxíciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se usan con los compuestos de la descripción, tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (p. ej., 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (p. ej., 5-FU y oligonucleótido durante un período de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros de tales agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). Los fármacos antiinflamatorios, que incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero no se limitan a, ribivirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones de la divulgación. Las combinaciones de compuestos antisentido y otros fármacos no antisentido también están dentro del alcance de esta descripción. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.
- En otro aspecto relacionado, las composiciones de la divulgación pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a una segunda diana de ácido nucleico. Por ejemplo, la primera diana puede ser una secuencia antisentido particular del gen de la Sirtuina 1 (SIRT1), y la segunda diana puede ser una región de otra secuencia de nucleótidos. Como alternativa, las composiciones de la divulgación pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones de la misma diana de nucleico de Sirtuina 1 (SIRT1). Se ilustran numerosos ejemplos de compuestos antisentido en este documento y otros pueden seleccionarse de entre compuestos adecuados conocidos en la técnica. Pueden usarse dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente.

Dosificación:

- Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) está dentro de la experiencia de los expertos en la materia. La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta de la patología a tratar, con el curso del tratamiento que dura desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología. Pueden calcularse programas de dosificación óptimos a partir de mediciones de acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos pueden determinar fácilmente dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente pueden estimarse basándose en las CE50 que se ha descubierto que son eficaces en modelos animales in vitro e in vivo. En general, la dosificación es de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una vez o más diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la materia pueden estimar fácilmente las tasas de repetición para la dosificación basándose en tiempos de residencia medidos y concentraciones del fármaco en fluidos corporales o tejidos. Tras el tratamiento satisfactorio, puede desearse que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para evitar la reaparición de la patología, en donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que varían de 0,01 µg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más diariamente, a una vez cada 20 años.

- En aspectos, un paciente se trata con una dosificación de fármaco que es al menos aproximadamente 1, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 35, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90, o al menos aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Ciertas dosis inyectadas de oligonucleótidos antisentido se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. No. 7,563,884, "Antisense modulation of PTP1B expression".

- Por su citación en diversas referencias en este documento, los solicitantes no admiten que ninguna referencia particular sea «técnica anterior» a su invención. Las realizaciones de composiciones y métodos inventivos se ilustran en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

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

- Ejemplo 1:** Diseño de oligonucleótidos antisentido específicos para una molécula de ácido nucleico antisentido a un polinucleótido de Sirtuina 1 (SIRT1) y/o una cadena con sentido de un polinucleótido de Sirtuina 1 (SIRT1).

Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión "oligonucleótido específico para" o "dianas de oligonucleótido" se refiere a un oligonucleótido que tiene una secuencia (i) capaz de formar un complejo estable con una parte del gen

elegido como diana, o (ii) capaz de formar un dúplex estable con una parte de un transcrito de ARNm del gen elegido como diana.

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

Un compuesto antisentido es «específicamente hibridable» cuando la unión del compuesto al ácido nucleico diana interfiere con la función normal del ácido nucleico diana para causar una modulación de la función y/o actividad, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones donde se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en condiciones donde se realizan ensayos en el caso de ensayos in vitro.

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

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

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

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

Para realizar el ensayo, el ADNc o un oligonucleótido correspondiente se mezclan con la Molécula en concentraciones definidas por los protocolos particulares del fabricante. La mezcla se calienta a 95 °C para disociar todos los complejos de ADNds previamente formados, a continuación, se enfría lentamente a temperatura ambiente u otra temperatura menor definida por el fabricante del kit para permitir que se hibriden las moléculas de ADN. Los complejos nuevamente formados a continuación se calientan lentamente a 95°C con recogida de datos continua simultánea en la cantidad de fluorescencia que es producida por la reacción. La intensidad de fluorescencia es inversamente proporcional a las cantidades de ADNds presentes en la reacción. Los datos pueden recopilarse usando un instrumento de PCR en tiempo real compatible con el kit (p. ej., sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus de ABI o el instrumento LightTyper, Roche Diagnostics, Lewes, RU).

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

Ejemplo 2: Modulación de polinucleótidos SIRT1

Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido:

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat # HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone cat # SH30024, o Mediatech cat # MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech cat # MT35-011-CV)+ penicilina/estreptomycin (Mediatech cat # MT30-002-CI)) a 37°C y 5% de CO₂. Un día antes del experimento las células se volvieron a cultivar a la densidad

de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat# 31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat# 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados de forma simulada. 3-18 h después de la incubación a 37°C y 5% de CO₂ el medio se cambió a medio de cultivo reciente. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y el ARN se extrajo de las células usando un sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o un kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat# 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron 600 ng de ARN extraído a la reacción de transcripción inversa realizada utilizando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat#AB1453B) o el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (cat# 4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat#4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (Ensayo de Expresión Génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00202021_m1 por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR; 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) usando la Máquina de PCR en Tiempo Real StepOne Plus (Applied Biosystems).

El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferente de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

Resultados:

Los resultados de la PCR en tiempo real que muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 aumentan significativamente 48 h después del tratamiento con algunos de los oligonucleótidos antisentido para CV396200 antisentido de SIRT1 (Figura 2, 3A).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 se incrementan significativamente en uno de los oligonucleótidos diseñados para CV396200 antisentido de SIRT1 (Figura 6).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 se incrementan significativamente en dos de los oligonucleótidos diseñados para CV428275 antisentido de SIRT1 (Figura 7).

Los resultados muestran un aumento significativo en los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 48 horas después del tratamiento con uno de los oligonucleótidos diseñados para BE717453 antisentido de SIRT. (Fig. 8).

Los resultados muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con tres de los oligonucleótidos diseñados para AV718812 antisentido de SIRT1 respectivamente (Figura 9).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los oligos diseñados para AW169958 antisentido de SIRT1 (Figura 10).

Tratamiento de células 3T3 con oligonucleótidos antisentido

Se cultivaron células 3T3 de ATCC (cat# CRL-1658) en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclone cat#SH30024, o Mediatech cat# MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech cat# MT35-011-CV)+ penicilina/estreptomicina (Mediatech cat# MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO₂. Un día antes del experimento las células se volvieron a cultivar a una densidad de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron dos µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat#31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat#11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células 3T3. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados de forma simulada. Después de 3-18 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂ el medio se cambió a medio de crecimiento fresco. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y el ARN se extrajo de las células usando un sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o un kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat#74181) siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron 600 ng de ARN extraído a la reacción de transcripción inversa realizada utilizando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat#AB1453B) o el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (cat#4368813) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat#4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (Ensayo de Expresión Génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00202021_m1 por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR; 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems).

El cambio de veces en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

Resultados:

5 Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células 3T3 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con tres de los oligonucleótidos diseñados para AK044604 antisentido de SIRT1 (Figura 11).

10 Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células 3T3 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con cinco de los oligonucleótidos diseñados para AK044604 antisentido de SIRT1 (Figura 12).

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células 3T3 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los oligonucleótidos diseñados para AK044604 antisentido de ratón de SIRT1 (Figura 13).

15 Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células 3T3 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con dos de los oligonucleótidos diseñados para AK044604 antisentido de ratón de SIRT1 (Figura 14).

Tratamiento de células Vero 76 con oligonucleótidos antisentido

Se cultivaron células Vero76 de ATCC (cat# CRL-1587) en medio de cultivo (MEM/EBSS (Hyclonecat #SH30024, o Mediatech cat # MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech cat# MT35-011-CV)+ penicilina/estreptomycin (Mediatech cat# MT30-002-CI)) a 37°C y el 5% de CO₂. Un día antes del experimento las células se volvieron a cultivar a la densidad de $1,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos incubadas a 37°C y 5% CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se cambió a medio de crecimiento fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron en agua a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat#31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat# 11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células Vero76. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados con de forma simulada. Después de 3-18 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂ el medio se cambió a medio de crecimiento fresco. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y el ARN se extrajo de las células usando un sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o un kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat# 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron 600 ng de ARN extraído a la reacción de transcripción inversa realizada utilizando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat#AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat#4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00202021_m1 por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR; 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). El nivel de cambio en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

Resultados:

Los resultados de PCR en tiempo real muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células Vero se incrementaron significativamente 48 h después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido para CV396200 antisentido de SIRT1 (Figura 3B).

Ejemplo 3: Modulación de la expresión del gen SIRT1

Materiales y Métodos

Tratamiento de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido desnudos:

Se cultivaron células HepG2 de ATCC (cat# HB-8065) en medio de crecimiento (MEM/EBSS (Hyclone cat #SH30024, o Mediatech cat # MT-10-010-CV) +10% FBS (Mediatech cat# MT35-011-CV)+ penicilina/estreptomycin (Mediatech cat# MT30-002-CI)) a 37°C y 5% de CO₂. Un día antes del experimento, las células volvieron a sembrarse en placas a la densidad de $0,5 \times 10^5$ /ml en placas de 6 pocillos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. El día del experimento, el medio en las placas de 6 pocillos se reemplazó con 1,5 ml/pocillo de medio de crecimiento fresco. Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron en agua a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat#31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat#11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células HepG2. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles

transfectados de forma simulada. Después de 3-18 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂ el medio se cambió a medio de crecimiento fresco. 72 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, las células se volvieron a dosificar como se describe anteriormente. 48 h después de la segunda dosificación de oligonucleótidos antisentido el medio se eliminó y el ARN se extrajo de las células usando un sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o un kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat# 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron 600 ng de ARN extraído a la reacción de transcripción inversa realizada utilizando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat#AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat#4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00202021_m1 por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo de PCR; 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 10 min, 40 ciclos de (95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 min) usando la máquina de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). El nivel de cambio en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

Cebadores y sonda para el ensayo Taqman diseñado a medida para el exón 4: AACTGGAGCTGGGGTGTCTGTTTCA (SEQ ID NO: 67) el CV396200 antisentido natural SIRT1.

Sec. cebador directo. CCATCAGACGACATCCCTTAACAAA (SEQ ID NO: 68)

Sec. cebador inverso ACATTATATCATAGCTCCTAAAGGAGATGCA (SEQ ID NO: 69)

Sec. Reportera CAGAGTTTCAATTCCC (SEQ ID NO:70)

Resultados:

Los resultados muestran que los niveles de ARNm de SIRT1 en células HepG2 se incrementan significativamente 48 h después del tratamiento con uno de los RNAsi diseñados para sirtas_5, P=0,01). En las mismas muestras, los niveles de ARN de sirtas disminuyeron significativamente después del tratamiento con sirtas_5, pero no se modificaron después del tratamiento con sirtas_6 y sirtas_7, que tampoco tuvieron efecto sobre los niveles de ARNm de SIRT1 (Fig. 1B). sirtas_5, sirtas_6 y sirtas_7 corresponden a SEQ ID NO: 32, 33 y 34 respectivamente.

Tratamiento de hepatocitos primarios de mono.

Se introdujeron hepatocitos primarios de mono en el cultivo por RxGen Inc. y se colocaron en placas de 6 pocillos. Se trataron con oligonucleótidos de la siguiente manera. Los medios en las placas de 6 pocillos se cambiaron a medios de crecimiento frescos que consisten en Medio de William (Sigma cat#W4128) suplementado con 5% de FBS, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin, 4 µg/ml de insulina, dexametasona 1 µM, 10 µg/ml de Fungin (InvivoGen, San Diego CA). Todos los oligonucleótidos antisentido se diluyeron a la concentración de 20 µM. Se incubaron 2 µl de esta solución con 400 µl de medio Opti-MEM (Gibco, cat#31985-070) y 4 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, cat#11668019) a temperatura ambiente durante 20 min y se aplicaron a cada pocillo de las placas de 6 pocillos con células. Se usó una mezcla similar que incluye 2 µl de agua en lugar de la solución de oligonucleótido para los controles transfectados de forma simulada. Después de 3-18 h de incubación a 37°C y 5% de CO₂ el medio se cambió a medio de crecimiento fresco. 48 h después de la adición de oligonucleótidos antisentido, el medio se eliminó y el ARN se extrajo de las células usando un sistema de aislamiento de ARN total SV de Promega (cat # Z3105) o un kit de aislamiento de ARN total RNeasy de Qiagen (cat # 74181) siguiendo las instrucciones del fabricante, se añadieron 600 ng de ARN extraído a la reacción de transcripción inversa realizada utilizando el kit de ADNc Verso de Thermo Scientific (cat # AB1453B) como se describe en el protocolo del fabricante. El ADNc de esta reacción de transcripción inversa se usó para monitorizar la expresión génica por PCR en tiempo real usando la mezcla de expresión génica Taqman de ABI (cat# 4369510) y cebadores/sondas diseñados por ABI (ensayo de expresión génica Taqman de Applied Biosystems: Hs00978340_m1 por Applied Biosystems Inc., Foster City CA). Se usó el siguiente ciclo: 50°C durante 2 min, 95°C durante 10 min, 40 ciclos de (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 min) utilizando el termociclador Mx4000 (Stratagene). El nivel de cambio en la expresión génica después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido se calculó basándose en la diferencia de valores de dCt normalizados contra 18S entre las muestras tratadas y las transfectadas de forma simulada.

Resultados:

Los resultados se muestran en la Figura 5. Los resultados de la PCR en tiempo real muestran un aumento en los niveles de ARNm de SIRT1 después del tratamiento con un oligonucleótido contra SIRT1 antisentido.

Ejemplo 4: Estudio de la eficacia y duración de la acción de CUR 963 en el mono verde africano

El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar el efecto de la inactivación antisentido de las secuencias antisentido no codificantes discordantes que regulan los genes SIRT1 después de la administración intravenosa en un modelo de primate no humano. Los artículos de ensayo de oligonucleótidos antisentido diseñados para inhibir las secuencias reguladoras de SIRT1 se designaron como CUR 963.

CUR 963: +G*+T*C*T*G*A*T*G*G*+A*+G*+A (SEQ ID NO: 28).

CUR 962 (control): +G*+C*T*A*G*T*C*T*G*+T*+T*+G (SEQ ID NO: 71).

DIRECTRICES REGULADORAS DE ENSAYOS

- 5 Este estudio se diseñó de acuerdo con principios toxicológicos aceptados y para cumplir con las directrices tripartitas armonizadas de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH) (estudios de seguridad no clínicos para la realización de ensayos clínicos en seres humanos para productos farmacéuticos ICH M3(m), 9 de noviembre de 2000), y procedimientos generalmente aceptados para el ensayo de agentes terapéuticos.

ARTÍCULOS DE ENSAYOS Y CONTROL

Ensayo de identidad y preparación del artículo

- 10 El artículo de ensayo, CUR-963, es un oligonucleótido antisentido químicamente estabilizado. El vehículo para el suministro intravenoso es solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Caracterización de vehículo

Para el vehículo PBS, la composición, el número de lote, la fecha de caducidad y las condiciones de almacenamiento (temperatura y luz/oscuridad) se obtuvieron del proveedor.

- 15 ***Ensayo de almacenamiento y manipulación de artículos***

La sustancia de ensayo y el vehículo se almacenaron de acuerdo con las condiciones de almacenamiento recibidas proporcionadas por el patrocinador y el fabricante, en consecuencia.

Análisis de las formulaciones del artículo de ensayo

- 20 Las muestras de la formulación del artículo de ensayo se crioconservaron para el análisis de la concentración, la estabilidad y la homogeneidad de las formulaciones de la sustancia de ensayo.

SISTEMA DE ENSAYO DE RACIONALIZACIÓN

- 25 El primate es una especie adecuada no roedora, aceptable para las autoridades reguladoras como un indicador de peligros potenciales, y para la cual se dispone de exhaustivos datos de antecedentes. El mono verde africano específicamente es un modelo altamente relevante clínicamente de múltiples estados fisiológicos y patológicos humanos.

La vía de administración intravenosa corresponde a una posible vía terapéutica humana. La dosis de los artículos de ensayo se basó en los resultados de los estudios de búsqueda de dosis de compuestos análogos realizados previamente en el mono verde africano.

- 30 Se eligió el mono verde africano como el primate de elección, ya que la secuencia diana de las sustancias de ensayo se conserva en todas las especies con el 100% de homología en primates. Además, la sustancia de ensayo es un oligonucleótido sintético. En consecuencia, la dosificación en primates permite una evaluación superior de la eficacia de estos compuestos que reflejaría más la captación que probablemente se observará en seres humanos que en cualquier otra especie.

ANIMALES

- 35 ***Especie***

Chlorocebus sabaeus, primate no humano

Raza

Mono verde africano originario de St Kitts.

Fuente

- 40 RxGen, Lower Bourryeau, St. Kitts, Indias Occidentales.

Edad esperada

Los animales de ensayo eran adultos.

Peso corporal esperado

Los monos pesan aproximadamente 3-4 kg. El intervalo real puede variar, pero se documentará en los datos.

Sexo

Los animales de ensayo eran hembras adultas.

Número de animales

Se seleccionaron diez animales para asegurar la identificación de 8 animales adecuados para la inclusión en el estudio.

5 Número en estudio

Mujeres: 8

Justificación para el número en estudio

Este estudio se diseñó para utilizar el menor número posible de animales, de acuerdo con el objetivo principal de evaluar la eficacia terapéutica del artículo de ensayo en el mono verde africano y los estudios previos de la administración sistémica de este tipo de oligonucleótido en esta especie.

Especificación de animales

Se emplearon en el estudio diez monos verdes africanos adultos en el intervalo de peso de 3 a 4 kg. Los monos eran animales adultos que no habían consumido fármacos y que habían sido atrapados por la población salvaje que habita la isla. Los monos atrapados fueron tratados con antihelmínticos para eliminar cualquier posible carga parasitaria intestinal y se observaron en cuarentena durante un mínimo de 4 semanas antes de la selección para la inclusión en el estudio. La edad de los monos atrapados se estimó por tamaño y dentación, con la exclusión de los animales más viejos del estudio. Antes de la inclusión en el estudio, se realizó un examen clínico en cada mono, incluida la evaluación de la locomoción y la destreza. Se tomaron muestras de sangre y se enviaron a Antech Diagnostics (Memphis, TN) para obtener datos químicos clínicos completos y un hemograma completo y perfiles de lípidos (véase las especificaciones en las secciones 9.2 y 319567928). Los monos con valores de laboratorio anormales, de acuerdo con lo determinado en comparación con el intervalo normal establecido para los monos en la colonia de St. Kitts, se excluyeron del estudio. Para identificar 8 monos que satisfacen este criterio, se cribaron 10 monos, con el cribado de animales adicionales conforme sea necesario. Antes de iniciar el estudio, los monos seleccionados serán transferidos a jaulas individuales para que se aclimaten a los alojamientos individuales durante un período de una semana. Solo los animales considerados adecuados para la experimentación serán incluidos en el estudio. Los intervalos reales (o estimados) de edad y peso al inicio del estudio se detallarán en los datos sin procesar y en el informe final.

Sanidad y bienestar animal

Se siguieron los patrones más altos de bienestar animal y se respetaron las directrices estipuladas por el Departamento de Agricultura de St. Kitts y el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. Todos los estudios se realizarán de acuerdo con estos requisitos y todos los códigos de práctica aplicables para el cuidado y alojamiento de animales de laboratorio. Todos los patrones aplicables para el cuidado, operación y revisión veterinarios, tal como los contenidos en la Guía de NIH Para el Cuidado y Uso de Animales. Las instalaciones de St. Kitts mantienen un comité de investigación con animales que revisa los protocolos e inspecciona las instalaciones de acuerdo con lo exige la Guía. La fundación tiene una garantía aprobada depositada ante la oficina de bienestar de los animales de laboratorio, de acuerdo con lo requiere la Guía, #A4384-01 (Fundación de Investigación Axion/Fundación Biomédica de St. Kitts). No hay problemas especiales de atención veterinaria de primates no humanos ni problemas de riesgo biológico planteados por la investigación especificada en este estudio.

Alojamiento y Medio Ambiente

Para permitir la detección de cualquier signo clínico relacionado con el tratamiento, los animales se alojaron individualmente antes de la cirugía y después de la operación hasta el sacrificio. El edificio de primates donde estaban situadas las jaulas individuales se iluminó completamente con luz ambiental, que a 17 grados de latitud norte se aproxima a un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas:12 horas, de acuerdo con lo recomendado en las directrices D.H.H.S. de EE.UU. El edificio de primates RxGen estaba completamente ventilado hacia el exterior. Los ventiladores de techo aseguraron un movimiento de aire adicional para mantener una temperatura diana constante de 23-35°C, como es típico de St. Kitts durante todo el año. Veinticuatro horas extremas de temperatura y humedad relativa (que tampoco se controlarán) se midieron diariamente. Durante el estudio, las jaulas se limpiaron a intervalos regulares.

Dieta y Agua

A cada animal se le ofrecieron aproximadamente 90 gramos por día de una dieta estándar de chow de mono (TekLad, Madison, WI). Se registró la composición nutricional específica de la dieta. El agua fue analizada periódicamente para la pureza microbiológica. Los criterios para los niveles aceptables de contaminantes en la dieta común y el suministro de agua estaban dentro de las especificaciones analíticas establecidas por el fabricante de la dieta y las evaluaciones periódicas de agua en las instalaciones, respectivamente. El agua cumplió con todos los criterios necesarios para la certificación como aceptable para el consumo humano.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Identificación y Aleatorización de Animales

La asignación se realizó mediante un procedimiento de aleatorización estratificado basado en el peso corporal y los perfiles de colesterol en plasma. Antes y después de la asignación a un grupo, cada animal fue identificado por un tatuaje en el abdomen. Los tatuajes se colocan en todos los animales de la colonia como un medio de identificación en el curso de las inspecciones de salud habituales. Se elaboró un plan de jaula para identificar a los individuos alojados en el interior, y los monos individuales se identificaron aún más mediante una etiqueta marcada en su jaula respectiva. *Tamaños de grupos, dosis y números de identificación.*

Números

Los animales fueron asignados a 2 grupos de tratamiento, compuestos por 4 monos en cada grupo. Se proporcionaron números de identificación de animales específicos a cada mono de acuerdo con el sistema de numeración de las instalaciones. Este sistema identifica de forma única a cada mono mediante una letra seguida de un número de tres dígitos, p. ej., Y032.

Vía y Frecuencia de Administración

Los animales recibieron dosis una vez al día en los Días 1, 3 y 5, suministrados por vía intravenosa mediante infusión manual durante aproximadamente ~10 min. La velocidad de infusión será de 24 ml/kg/h. Los animales se sedaron con ketamina y xilazina antes y durante el procedimiento de dosificación. Se insertó un catéter venoso (equipo de infusión de venas Terumo mini, aguja de calibre 20 o equipo de infusión adecuado similar) en la vena safena. La dosificación se realizó en cada mono entre las 8:00 y las 10:00 am, poco después de que los animales se despertaran y antes de la alimentación. Se recogió una muestra de sangre para evaluar el colesterol en plasma y otros niveles de lípidos como se describe en la sección de Química de la Sangre a continuación, justo antes de cada infusión. La recogida de sangre precedió a la alimentación a ambos intervalos de muestreo para minimizar los efectos dietéticos en las mediciones de colesterol.

Observaciones Clínicas

Todos los signos visibles de reacción al tratamiento se registraron en cada día de dosificación. Además, los animales fueron examinados al menos una vez a la semana en busca de atributos físicos como el aspecto y el estado general.

Pesos Corporales

Los pesos corporales se registraron a intervalos semanales durante los períodos de tratamiento y postratamiento.

Consumo de Alimentos

El consumo individual de alimentos no fue cuantificado. Sin embargo, los patrones de alimentación se monitorearon y se hizo una nota de cualquier cambio importante.

Mortalidad y Morbilidad

Se registrará la mortalidad y la morbilidad. Cualquier decisión con respecto al sacrificio prematuro se tomará después de consultar con el director del estudio y con el científico de monitorización del patrocinador, si es posible. Los animales que se encuentren muertos o muertos prematuramente se someterán a una necropsia con la recogida de tejidos de hígado, riñón, corazón, bazo y pulmón para histopatología. En caso de un sacrificio prematuro, también se tomará una muestra de sangre (si es posible) y se determinarán los parámetros. Los animales que se encuentren muertos después de las horas normales de trabajo se refrigerarán durante la noche y se realizarán las necropsias al comienzo del siguiente día laborable. Si el estado de un animal requiere un sacrificio prematuro, será sacrificado por una sobredosis intravenosa de pentobarbital de sodio. Toda investigación está regida por los Principios de Uso de Animales. Se requiere por ley que RxGen cumpla con los estándares del Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. para las instalaciones de primates, que dictan los niveles de gravedad que deben cumplir los procedimientos dentro de este estudio, especificados como leves.

ESTUDIOS DE LABORATORIO CLÍNICO

Biopsias Grasas

Se realizó una biopsia de grasa subcutánea en todos los monos del estudio excepto en Y775 en los días 26 del estudio mediante extracción de tejido a través de una incisión en la línea media de 1 cm por debajo del ombligo. Las biopsias se sumergieron inmediatamente en un criotubo etiquetado que contenía 2 ml de RNAlater (Qiagen) y se incubaron a 4°C durante la noche, después de lo cual se aspiró el RNAlater y el tubo de muestra se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido. Después del transporte en nitrógeno líquido, se aisló el ARN total para qPCR en tiempo real de los genes diana.

Resultados:

Los resultados de PCR en tiempo real muestran un aumento en los niveles de ARNm de SIRT1 en biopsias de grasa de monos que recibieron CUR-963, un oligonucleótido diseñado para CV396200.1 antisentido de SIRT1, en comparación con monos que recibieron CUR-962 (SEQ ID NO.: 71), un oligonucleótido que no tenía efecto sobre la expresión de SIRT1 *in vitro* (diseñado para DA327409 antisentido de ApoA1, datos no mostrados). Los niveles de ARNm se determinaron mediante PCR en tiempo real (Figura 4).

Ejemplo 5: Modulación *in vivo* de Sirtuina 1 (SIRT1) por oligonucleótidos de ADN antisentido**Tratamiento con oligonucleótidos de ADN antisentido (ASO)**

Se administran oligonucleótidos antisentido (ASO) específicos para SIRT1 AS (por ejemplo, CUR-1098 o CUR1099) a ratones C57B1/6J que se alimentan con una dieta alta en grasas durante 12 semanas para inducir obesidad y diabetes. (Purushotham A. et al., (2009) Cell Metabolism 9, pág. 327-338). El tratamiento de los ratones con ASO se iniciará en el momento de la implementación de la dieta alta en grasas. A los ratones se les inyecta IP una vez a la semana con ASO preparado en solución salina normal, a una concentración de 5 mg/kg.

Mediciones de peso corporal e ingesta alimentaria.

El peso corporal y la ingesta de alimentos de los ratones se miden dos veces por semana, antes de la inyección IP del ASO.

Mediciones de glucosa en sangre

Las concentraciones de glucosa en sangre alimentadas y en ayunas se miden cada semana tomando una muestra de sangre de la vena de la cola.

Ensayos de Tolerancia a la Glucosa (GTT)

El GTT se realizará totalmente dos veces por ratón, a la mitad de la dieta (en la semana 4) y cerca del final (en la semana 10) de la dieta alta en grasas. El GTT nos informará sobre la tolerancia a la glucosa de los ratones, es decir, la capacidad de eliminar rápidamente un bolo de glucosa del torrente sanguíneo. Esta es una medida de la diabetes.

Los ratones se dejan en ayunas durante la noche durante 16 horas. A los ratones se les inyecta 2 g/kg de glucosa IP. esto se traduce en un volumen final de 0,2ml 30% (p/v) de solución de glucosa para un ratón de 30 g de peso. Las mediciones de glucosa se toman antes de la inyección de glucosa y a los 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la inyección. La glucosa se mide cortando la punta de la cola a 1 mm del extremo de la cola bajo anestesia con isoflurano antes de la inyección de glucosa IP. La gota de sangre se aspira a una tira y se mide la concentración de glucosa con un glucómetro. El GTT se realizará totalmente dos veces por ratón, a la mitad de la dieta (en la semana 4) y cerca del final (en la semana 10) de la dieta alta en grasas. El GTT nos informará sobre la tolerancia a la glucosa de los ratones, es decir, la capacidad de eliminar rápidamente un bolo de glucosa del torrente sanguíneo. Esta es una medida de la diabetes.

Ensayo de tolerancia a la insulina (ITT)

Los ratones se dejan en ayunas durante 6 horas desde las 9 am hasta las 3 pm. A los ratones se les inyecta IP 0,5-1U de Insulina/kg. La concentración de insulina se ajustará de forma que el volumen final inyectado es de 0,1-0,15ml. Las mediciones de glucosa en sangre se toman antes de la inyección y a los 5, 15, 30, 45 y 60 minutos después de la inyección. La sangre se recolecta exactamente como se describe en GTT. Además de monitorear los niveles de glucosa, el comportamiento de los ratones se observa constantemente durante el ITT. La hipoglucemia puede manifestarse como un cambio de comportamiento y los animales se vuelven muy tranquilos y muestran malestar. Para prevenir la hipoglucemia, se inyecta glucosa (1g/kg) IP a un volumen final de 0,1-0,15 ml tan pronto como la concentración de glucosa en sangre cae por debajo de 50 mg/ml o se observen signos de malestar.

Recolección de sangre por Punción de la Vena Facial

Los ratones son inmovilizados por la nuca del cuello y la base de la cola, comprimiendo ligeramente los vasos sanguíneos del cuello a través de la tensión del agarre en la piel del cuello. El sitio de muestreo está en la mandíbula, ligeramente por delante del ángulo de la mandíbula. La piel en el lugar de la muestra se perfora con una aguja de 18G o una lanceta en un ángulo de 90° hasta que la punta de la aguja/lanceta apenas atraviesa la piel. Las muestras de sangre se recogen utilizando tubos de microhematocrito. Después de que se ha recogido la sangre, el agarre del cuello se afloja y la presión se aplica en el sitio de inserción con una esponja calibrada para asegurar la hemostasis. Se recogerán 0,05-0,2 ml de sangre mediante este método. Este procedimiento se realizará solo una vez en la semana 5 de la dieta alta en grasas y, finalmente, en la semana 12 si la punción intracardiaca no funciona (ver más abajo). Las hormonas sanguíneas que regulan el metabolismo de la glucosa y los lípidos (tales como insulina, adiponectina y leptina) se miden utilizando kits de ELISA disponibles comercialmente. (p. ej., R&D Systems, Minneapolis, MN, Assay Pro St. Charles, MO, Mabtech, Mariemont, OH)

Punción Intracardiaca

- Al final de la dieta alta en grasas de 12 semanas, los ratones serán anestesiados por inhalación continua de isoflurano. La anestesia se induce colocando a los ratones en una caja de inducción, que se suministra con isoflurano y oxígeno. Los ratones se sujetarán boca arriba. El corazón se perfora con una aguja 27G. Después de la exanguinación, se
- 5 decapita la cabeza para asegurar la muerte. Se recogen tejidos (hígado, páncreas, tejido adiposo blanco y marrón y músculo esquelético) para investigaciones adicionales (mediciones de ARN y proteínas e histología). Alrededor de 0,5-1 ml de sangre se obtendrá y se usará para determinar diversos parámetros críticos de la glucosa y el metabolismo de lípidos (glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, leptina, adipoquinas, corticosteroides, hormonas tiroideas). Si surgen dificultades con este método, recolectaremos sangre por punción en la vena facial bajo
- 10 anestesia con isoflurano (ver arriba).

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> CuRNA, Inc.
	TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON SIRTUINA 1 (SIRT1) MEDIANTE INHIBICIÓN DEL TRANSCRITO DEL ANTISENTIDO NATURAL A SIRTUINA 1
5	<130> P37642EP-D1-PCT
	<140> Aún no asignado
	<141> 03-03-2010
	<150> EP10749298.5
	<151> 03-03-2010
10	<150> US 61/157,255
	<151> 04-03-2009
	<150> US 61/259,072
	<151> 06-11-2009
	<150> PCT/US2009/066445
15	<151> 12-02-2009
	<160> 73
	<170> PatentIn versión 3.5
	<210> 1
	<211> 4107
20	<212> ADN
	<213> Homo sapiens
	<300>
	<308> NM_012238.3
	<309> 2010-08-29
25	<313> (1)..(4107)
	<400> 1

ES 2 845 644 T3

gtcgagcggg agcagaggag gcgagggagg agggccagag aggcagttgg aagatggcgg	60
acgaggcggc cctcgccctt cagcccggcg gctccccctc ggcggcgggg gccgacaggg	120
aggccgcgtc gtcccccgcc ggggagccgc tccgcaagag gccgcggaga gatgggtccc	180
gcctcgagcg gagccccggc gagcccgggt gggcggcccc agagcgtgag gtgccggcgg	240
cggccagggg ctgcccggtt gcggcggcgg cggcgtgtg gcgggaggcg gaggcagagg	300
cggcggcggc aggcggggag caagagggcc aggcgactgc ggcggctggg gaaggagaca	360
atgggccggg cctgcagggc ccatctcggg agccaccgct ggccgacaac ttgtacgacg	420
aagacgacga cgacgagggc gaggaggagg aagaggcggc ggcggcggcg attgggtacc	480
gagataacct tctgttcggt gatgaaatta tcactaatgg ttttcattcc tgtgaaagtg	540
atgaggagga tagagcctca catgcaagct ctagtactg gactccaagg ccacggatag	600
gtccatatac ttttgttcag caacatctta tgattggcac agatcctcga acaattctta	660
aagatttatt gccggaaaca atacctccac ctgagttgga tgatatgaca ctgtggcaga	720

ES 2 845 644 T3

ttgttattaa tatcctttca gaaccaccaa aaaggaaaaa aagaaaagat attaatacaa	780
ttgaagatgc tgtgaaatta ctgcaagagt gcaaaaaaat tatagttcta actggagctg	840
gggtgtctgt ttcatgtgga atacctgact tcagggtcaag ggatgggtatt tatgctcgcc	900
ttgctgtaga cttcccagat cttccagatc ctcaagcgat gtttgatatt gaatatttca	960
gaaaagatcc aagaccattc ttcaagtttg caaaggaaat atatcctgga caattccagc	1020
catctctctg tcacaaattc atagccttgt cagataagga aggaaaacta cttcgcaact	1080
ataccagaa catagacacg ctggaacagg ttgcggaat ccaaaggata attcagtgtc	1140
atggttcctt tgcaacagca tottgctga tttgtaaata caaagttgac tgtgaagctg	1200
tacgaggaga tatttttaaat caggtagttc ctcgatgtcc taggtgcccc gctgatgaac	1260
cgcttgctat catgaaacca gagatttgtt tttttggtga aaatttacca gaacagtttc	1320
atagagccat gaagtatgac aaagatgaag ttgacctcct cattgttatt gggctctccc	1380
tcaaagtaag accagtagca ctaattccaa gttccatacc ccatgaagtg cctcagatat	1440
taattaatag agaacctttg cctcatctgc attttgatgt agagcttctt ggagactgtg	1500
atgtcataat taatgaattg tgtcataggt taggtggtga atatgccaaa ctttgctgta	1560
accctgtaaa gctttcagaa attactgaaa aacctccagc aacacaaaaa gaattggctt	1620
atgtgtcaga gttgccaccc acacctcttc atgtttcaga agactcaagt tcaccagaaa	1680
gaacttcacc accagattct tcagtgattg tcacactttt agaccaagca gctaagagta	1740
atgatgattt agatgtgtct gaatcaaaaag gttgtatgga agaaaaacca caggaagtac	1800
aaacttctag gaatgttgaa agtattgctg aacagatgga aaatccggat ttgaagaatg	1860
ttggttctag tactggggag aaaaatgaaa gaacttcagt ggctggaaca gtgagaaaat	1920
gctggcctaa tagagtggca aaggagcaga ttagtagggc gcttgatggg aatcagtatc	1980
tgtttttgcc accaaatcgt tacattttcc atggcgctga ggtatattca gactctgaag	2040
atgacgtctt atcctctagt tcttgtggca gtaacagtga tagtgggaca tgccagagtc	2100
caagtttaga agaaccocat gaggatgaaa gtgaaattga agaattctac aatggcttag	2160
aagatgagcc tgatgttcca gagagagctg gaggagctgg atttgggact gatggagatg	2220
atcaagaggc aattaatgaa gctatatctg tgaaacagga agtaacagac atgaactatc	2280
catcaaacia atcatagtgt aataattgtg caggtagagg aattgttcca ccagcattag	2340
gaacttttagc atgtcaaaat gaatgtttac ttgtgaactc gatagagcaa ggaaaccaga	2400
aagggtgaat atttataggt tggtaaaata gattgttttt catggataat ttttaacttc	2460
attatttctg tacttgtaca aactcaacac taactttttt ttttttaaaa aaaaaaaggt	2520
actaagtatc ttcaatcagc tgttggtcaa gactaacttt cttttaaaagg ttcatttcta	2580
tgataaattc atatgtgtat atataatttt ttttgttttg tctagtgagt ttcaacattt	2640

ES 2 845 644 T3

ttaaagtttt caaaaagcca tcggaatggt aaattaatgt aaagggacag ctaatctaga	2700
ccaaagaatg gtattttcac ttttctttgt aacattgaat ggtttgaagt actcaaaatc	2760
tgttacgcta aacttttgat tctttaacac aattattttt aaacactggc attttcctaaa	2820
actgtggcag ctaacttttt aaaatctcaa atgacatgca gtgtgagtag aaggaagtca	2880
acaatatgtg gggagagcac tcgggtgtct ttacttttaa aagtaatact tgggtgctaag	2940
aatttcagga ttattgtatt tacgttcaaa tgaagatggc ttttgtactt cctgtggaca	3000
tgtagtaatg tctatattgg ctcataaaac taacctgaaa aacaaataaa tgctttggaa	3060
atgtttcagt tgctttagaa acattagtgc ctgcctggat ccccttagtt ttgaaatatt	3120
tgccattggt gtttaaatac ctatcactgt ggtagagctt gcattgatct tttccacaag	3180
tattaaactg ccaaaatgtg aatatgcaaa gcctttctga atctataata atggtacttc	3240
tactggggag agtgaatat tttggactgc tgttttccat taatgaggag agcaacaggc	3300
ccctgattat acagttccaa agtaataaga tgttaattgt aattcagcca gaaagtacat	3360
gtctcccatt gggaggattt ggtgttaaat accaaactgc tagccctagt attatggaga	3420
tgaacatgat gatgtaactt gtaatagcag aatagttaat gaatgaaact agttcttata	3480
atztatcttt atttaaaagc ttagcctgcc ttaaaactag agatcaactt tctcagctgc	3540
aaaagcttct agtctttcaa gaagttcata ctttatgaaa ttgcacagta agcatttatt	3600
tttcagacca tttttgaaca tcaactcctaa attaataaag tattcctctg ttgctttagt	3660
atztatatac ataaaaaggg tttgaaatat agctgttctt tatgcataaa acaccagct	3720
aggaccatta ctgccagaga aaaaaatcgt attgaatggc catttcccta cttataagat	3780
gtctcaatct gaattttatt ggctacacta aagaatgcag tatatttagt tttccatttg	3840
catgatgttt gtgtgctata gatgatattt taaattgaaa agtttggttt aaattatttt	3900
tacagtgaag actgttttca gctcttttta tattgtacat agtcttttat gtaatttact	3960
ggcatatggt ttgtagactg tttaatgact ggatatcttc cttcaacttt tgaaatacaa	4020
aaccagtgtt ttttacttgt acactgtttt aaagtctatt aaaattgtca tttgactttt	4080
ttctgttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	4107

<210> 2

<211> 3806

<212> ADN

<213> Mus musculus

<300>

<308> NM_001159589.1

<309> 29-08-2010

<313> (1)..(3806)

<400> 2

ES 2 845 644 T3

gccagtgccg	cgcgtcgagc	ggagcagagg	agcgaggggc	ggagggccag	agaggcagtt	60
ggaagatggc	ggacgaggtg	gcgctcgccc	ttcaggccgc	cggctcccct	tccgcggcgg	120
ccgccatgga	ggccgcgtcg	cagccggcgg	acgagccgct	ccgcaagagg	ccccgccgag	180
acgggcctgg	cctcggggcg	agcccggcgg	agccgagcgc	agcagtggcg	ccggcggccg	240
cggggtgtga	ggcggcgagc	gccgcggccc	cggcggcgct	gtggcgggag	gcggcagggg	300
cggcggcgag	cgcggagcgg	gaggccccgg	cgacggccgt	ggccggggac	ggagacaatg	360
ggtccggcct	gcggcgggag	ccgagggcgg	ctgacgactt	cgacgacgac	gagggcgagg	420
aggaggacga	ggcggcggcg	gcagcggcgg	cggcagcgat	cggctaccga	ggtccatata	480
cttttgttca	gcaacatctc	atgattggca	ccgatcctcg	aacaattctt	aaagatttat	540
taccagaaac	aattcctcca	cctgagctgg	atgatatgac	gctgtggcag	attgttatta	600
atatcctttc	agaaccacca	aagcggaaaa	aaagaaaaga	tatcaataca	attgaagatg	660
ctgtgaagtt	actgcaggag	tgtaaaaaga	taatagtctt	gactggagct	ggggtttctg	720
tctcctgtgg	gattcctgac	ttcagatcaa	gagacggtat	ctatgctcgc	cttgcgggtg	780
acttcccaga	cctcccagac	cctcaagcca	tgtttgatat	tgagtatttt	agaaaagacc	840
caagaccatt	cttcaagttt	gcaaaggaaa	tatatcccgg	acagttccag	ccgtctctgt	900
gtcacaaatt	catagctttg	tcagataagg	aaggaaaact	acttcgaaat	tatactcaaa	960
atatagatac	cttggagcag	gttgacagg	tccaaaggat	ccttcagtgt	catggttcct	1020
ttgcaacagc	atcttgccctg	atgtgtaaat	acaaagttga	ttgtgaagct	gttcgtggag	1080
acatttttaa	tcaggtagtt	cctcggtgcc	ctaggtgccc	agctgatgag	ccacttgcca	1140
tcatagaagc	agagattgtc	ttctttggtg	aaaacttacc	agaacagttt	catagagcca	1200
tgaagtatga	caaagatgaa	gttgacctcc	tcattgttat	tggatcttct	ctgaaagtga	1260
gaccagtagc	actaattcca	agttctatac	cccatgaagt	gcctcaaata	ttaataaata	1320
gggaaccttt	gcctcatcta	cattttgatg	tagagctcct	tggagactgc	gatgttataa	1380
ttaatgagtt	gtgtcatagg	ctaggtggtg	aatatgccaa	actttgttgt	aaccctgtaa	1440
agctttcaga	aattactgaa	aaacctccac	gccacaaaa	ggaattggtt	catttatcag	1500
agttgccacc	aacacctctt	catatttcgg	aagactcaag	ttcacctgaa	agaactgtac	1560
cacaagactc	ttctgtgatt	gctacacttg	tagaccaagc	aacaaacaac	aatgttaatg	1620
atttagaagt	atctgaatca	agttgtgtgg	aagaaaaaac	acaagaagta	cagactagta	1680
ggaatgttga	gaacattaat	gtggaaaatc	cagattttta	ggctgttggt	tccagtactg	1740
cagacaaaaa	tgaagaact	tcagttgcag	aaacagtgag	aaaatgctgg	cctaatagac	1800
ttgcaaagga	gcagattagt	aagcggcttg	agggtaatca	atacctgttt	gtaccaccaa	1860
atcgttacat	attccacggg	gctgaggtat	actcagactc	tgaagatgac	gtcttgcctt	1920

ES 2 845 644 T3

ctagttcctg	tggcagtaac	agtgacagt	gcacatgcc	gagccaagt	ttagaagaac	1980
ccttggaaga	tgaaagtga	attgaagaat	tctacaatgg	cttggaagat	gatacggaga	2040
ggcccgaatg	tgctggagga	tctggatttg	gagctgatgg	aggggatcaa	gaggttggtta	2100
atgaagctat	agctacaaga	caggaattga	cagatgtaaa	ctatccatca	gacaaatcat	2160
aacactattg	aagctgtccg	gattcaggaa	ttgctccacc	agcattggga	actttagcat	2220
gtcaaaaaat	gaatgtttac	ttgtgaactt	gaacaaggaa	atctgaaaga	tgtattatgt	2280
atagactgga	aaatagattg	tcttcttgga	taatttctaa	agttccatca	tttctgtttg	2340
tacttgatga	ttcaacactg	ttggttgact	tcattcttct	ttcaagggtc	atttgatgga	2400
tacattcgta	tgtatgtata	attttgtttt	ttgcctaata	agtttcaacc	ttttaaggtt	2460
ttcaaaagcc	attggaatgt	taatgtaaag	ggaacagctt	atctagacca	aagaatggta	2520
tttcacactt	ttttgtttgt	aacattgaat	agttttaaag	cctcaatttc	tgttctgctg	2580
aacttttatt	tttaggacag	tttaactttt	aaacactggc	attttccaaa	acttggtgga	2640
gctaactttt	taaaatcaca	gatgacttgt	aatgtgagga	gtcagcaccc	tgtctggagc	2700
actcaaaact	tggtgctcag	tgtgtgaagc	gtacttactg	catcggtttt	gtacttgctg	2760
cagacgtggt	aatgtccaaa	caggcccctg	agactaatct	gataaatgat	ttggaaatgt	2820
gtttcagttg	ttctagaaac	aatagtgcct	gtctatatag	gtccccttag	tttgaatatt	2880
tgccattggt	taattaaata	cctatcactg	tggtagagcc	tgcatagatc	ttcaccacaa	2940
atactgccaa	gatgtgaata	tgcaaagcct	ttctgaatct	aataatggta	cttctactgg	3000
ggagagtgtg	atattttgga	ctgctgtttt	tccattaatg	aggaaagcaa	taggcctctt	3060
aattaaagtc	ccaaagtcac	aagataaatt	gtagctcaac	cagaaagtac	actggtgcct	3120
gttgaggatt	tggtgtaatg	tatcccaagg	tgtagccctt	gtattatgga	gatgaataga	3180
gatccaatag	tcaaatgaaa	ctagttctta	gttattttaa	agcttagctt	gccttaaaac	3240
tagggatcaa	ttttctcaac	tgcaaaaact	tttagccttt	caaacagttc	acacctcaga	3300
aagtcagtat	ttattttaca	gacttctttg	gaacattgcc	cccaaattta	aatattcatg	3360
tggtgttagt	atttattaca	aaaaaatgat	ttgaaatata	gctgttcttt	atgcataaaa	3420
taccagttta	ggaccattac	tgccagagga	gaaaagtatt	aagtagctca	tttccctacc	3480
taaaagataa	ctgaatttat	ttggctacac	taaagaatgc	agtatattta	gttttccatt	3540
tgcatgatgt	gtttgtgcta	tagacaatat	tttaaattga	aaaatttggt	ttaaattatt	3600
tttacagtga	agactgtttt	cagctctttt	tatattgtac	atagactttt	atgtaatctg	3660
gcataatgtt	tgtagaccgt	ttaatgactg	gattatcttc	ctccaacttt	tgaaatacaa	3720
aaacagtgtt	ttatacttgt	atcttggttt	aaagtcttat	attaaaattg	tcatttgact	3780
tttttccgtg	taaaaaaaaa	aaaaaa				3806

<210> 3

<211> 26984

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 845 644 T3

gtgtctgttt catgtggaat acctgacttc aggtcaaggg atggatattta tgctcgctt	60
gctgtagact tcccagatct tccagatcct caagcgatgt ttgatattga atatttcaga	120
aaagatccaa gaccattctt caagtttgca aaggtagctat gaactcttct gggtgtttct	180
ttggccttct ctcatgaaaa agtattttgt tcacatacag ccaccttaag gttatcgctc	240
attgtttagt aaagtgaatg ctgctactgt ggcggagtaa gatcactcat tatggctaga	300
attcctttat tcctagagga ggactattat ctacttcatt ttaggagtga gcttattttc	360
aaagagatag ttcataatttt taaaatttgc actgcagcga tggctggttat tctgcctggg	420
cttttttaag aggtttgcac accatataaa agtaacataa cttgtgattt ttaatatatt	480
attagagatt gtaaagggtta taacatcact ttgggtgtttc gtagtcaagt ttaacataa	540
ggatgtgcct gaaaaatcat ttgtaattag agaatgggaa gattcttggg ttgcattttt	600
gtcagcaaat tgcagaggat cattattctg ctctagagtt gcaccgtcca gttcagaagc	660
cactagccac atgtggctgt tgagtacttg aaatgtattg atatgtgcaa taagtgtaga	720
agacatattg gatttttagag atccagtagt gaaaatacaa agtatttcatt tagttttatt	780
catcaaatat taaacaaata ttggttttta tatggaaaaa atacttaaaa ttaattttga	840
attcttttga aatacttttg atattgggtt aaataaaatg tattttgggc tgtgcgtggt	900
gcctcatgcc tgtaatttca gcactttggg aggccaaggt gggaggatca gttgagccca	960
ggagtttgag accagcctga gcaacataat gagactccat ctctacaaaa taaataataa	1020
aatttgctga gcatgggtgt gtgcacctgt agacccatcc actcagtagt ctgaggtggg	1080
aagatccctt gagctcagga gctcaagact gagtgaacca tgatctgcca ttgcactcca	1140
ccctgggcaa cagagcaaga gtgtttccaa aatatatgta tgttttttga agtttacttt	1200
tttttttttt ctttttttga gaagtagtct tcctttgtcc cccaggctgg agtgcaatgg	1260
catgatcttg gctcatagca acctctgcct cccaggttca agtgattctc ctgcctcagc	1320
atcctgagta gctgggatta caggcgcccg ctaccatgcc cagctaattt ctgtattttt	1380
agtagagaca gggtttcacc aggttggccca ggctggtgtt gaactcctga cttcaggtga	1440
tccaccctcc tcggcctccc aaggctctgg gattatagga gtgagccacc gcgcctggcc	1500
agttttcacc ttaatgtggt tactaaacaa tttaaagtta tatgtatgtc tcacattatg	1560
tacctattgt acagctctgc tttagcatag aaagtttaat aatgcattac accattctca	1620

ES 2 845 644 T3

agagattgag	tcattagaaa	actgttttct	ttcctgtatt	tcagtctttt	ggaaagaaat	1680
tacaaaattt	gttattgtta	aacttgagg	tatatatatt	tgaaagagtc	attttatttt	1740
attttacttt	aagtgcggg	atacatgtgc	agaatgcgca	gatttggtta	cataggtata	1800
catgtgccat	ggtggtttgc	tgcactatc	aacctgtcat	ctaggttgta	agccccacat	1860
tcattaggta	tttgtcctaa	tgtttttcca	ccccttgccc	cccacctcct	gacaggcctc	1920
tgtgtgtggt	gttccccacc	ctgtgtccat	gtgttcttat	tgttcaactc	tcacttatga	1980
gtgaggacat	gtggtgtttg	gttttctgtt	cttgtgttag	tttgtgagg	atgatggctt	2040
ccagcgaagg	agtcttgtat	tagtggtttt	ttccccacct	aatcgttaga	agttgtgaat	2100
agggacttct	ttaatgaatc	cagaagttaa	tgaacctagc	tttttttttt	tttttttttg	2160
agacggagtc	tggctctgtt	tcccaggctg	gagtgtagt	gtgtgatctc	tgctcaccat	2220
acaacctcca	cttcccgagt	tcaagagatt	ctcctgcctc	agccttccga	gttggtggga	2280
ctacaggcgc	gtgctgccat	gcctggctaa	tttttgtatt	tttggttagag	acggggattc	2340
actatgtttg	ccaggttggg	cttgaactcc	tgacctgtg	gtccgcccac	ctcagcctcc	2400
caaagtgcct	ggattacagg	tgcgaggcac	cgcgccccgc	gccctgccga	tgaacctaaa	2460
ttttaactaa	acagtggcct	tatctacttt	cagaccatgt	ggtatattta	catgactaca	2520
ggagaagctt	tgctaattca	gaataaatta	tgttacttaa	attggcgact	gtctttaaaa	2580
aaaaagtgat	tttttggatg	cagtagctcg	tgcctataat	cccagtgcct	tgggaagctg	2640
agataggaag	atctcttgaa	ctccggagtt	tgagaccagc	ctgcgcaaca	cagtgaagacc	2700
ctaactacta	cacctctcca	ccccatgtaa	cttttgtttt	atccaggttg	tggtatatta	2760
aatgggcatt	agtgtaaagt	gggaaaatta	tattaattct	tgaatatgat	tactaaactg	2820
aatttgaaaa	gttttcaggc	tatcaagaga	atttttaact	taaaacttat	ataatttgaa	2880
ctttttactt	catatatccg	taatgatgat	ggtcatctat	atctagcttt	tagagcagac	2940
aactggttca	tacctggatt	aaataaataa	tgtaaagtta	ttttttgtta	attatggatt	3000
agtgaagatt	tactgtttta	acctactcct	gctagtggca	ctactgcatg	gttttgaaga	3060
ccagtgaagt	atgacttaaa	ggtttcttga	attggagcta	ggacactggc	atttataaaa	3120
tctccacgta	gcgcagacat	tgacactatc	agaagaccag	caagtaacta	gaagttactt	3180
tgatcttaaa	tcaactacaa	aaaacttgac	tcactagtta	tggagaatac	attttttatt	3240
gttaaaactga	aaaaaaattc	agtcacttat	aaggtgtagc	ctcttctaata	cctgtttata	3300
taaatttatt	tattattatt	attttttgag	atggagtctt	gctctgttgc	caggctgtag	3360
tgcattggcg	cgatctcggc	tcactgcac	ctccacctcc	cgggttcaag	caattctctt	3420
gcctcagcct	cccaagtagc	tgggactaca	ggcacgtgcc	atcacgatca	gcacttttag	3480
tagagacggg	gtttcaccat	gttggcaagg	acgtgtctcg	tcgtgacctc	gtgatccgcc	3540

ES 2 845 644 T3

cgtttcagcc tcccaaagtg ttgggattac aggtgtgagc cacaatgtcc agctgataaa	3600
tttaattttg cttttctgag ttttcattta tggtaatggt taaatcagct aggctttaca	3660
gttgttactc acatataatt ctttgtccat cctttaattc tcacattggg aactgactaa	3720
aaaaagaaag cttccagtct gggcacagtg gctcacacct gtaatcccag cactttggga	3780
ggccgaggtg ggtggatcac ctgaggtcag gagttcaaga ccagcctggc caacacagca	3840
ataccccgctc tctaataaaa aatacaaaaa tcagccaggc ttgggtggcg ggcgcctgtc	3900
gtcccagcta cgcaggaggc tgagacgggg agaattgctt gaagccagga ggtggaggtt	3960
gcagtgagcc gaaagcgctt aaggagaaat aagtaaggac aaagagtgca ggatagatc	4020
ctgacacgga ggatggggag ggtatgtaaa tattgtcgat attttactga atttctaaat	4080
attacaagaa tagaatattc ataggataac ctaagctttt ctgtgagtca gtgtactagg	4140
cagaaagttc actaaagtgg tttatgattt ttgctactta tgagaaaaca ttaaaaatga	4200
agccatgaaa aggaaatatt ggtgaaattt agatacttca gaaggaaaga gagactttct	4260
tttttttttg gaaagaattt ctataccatc tattatatca ttgattgtat gtgattattg	4320
agaattaact tgtttttttt ttttttgttt tttttttttg agacagtttt gctcttgtca	4380
cccaggtctg agtgccctgg tgagatctcg gctcactaca accttcacct cccgagttca	4440
agcaattctg ctgcctcagt ctactgagta gctgggatta caggtgccca tcaccacgcc	4500
cagctaattt ttctaattt agtagagacg ggatttcacc atgttggtca ggctggtctc	4560
gaactcctga cctcaggtga tccgcccgcc taggccaaag tgctgggatt acaggcgtga	4620
gtctcccacg cccagccctt aaatttcatt tagactggaa atttcaagta atggagaggt	4680
gtgttaagga agttattgct ctgttagagc agtttcttaa atttggcact attgacattt	4740
tgggctggat ttttctttt gtttctgaga tagtttctact ctgtcgagcc atcacagctc	4800
gttgacagct tgaactcctg ggctccttga acaggaggct cctgcctgag cctcctgagt	4860
agctgagacc ataggcacgt accatatacc tagctaaatg tgtttttgac tttctttttt	4920
ctttgtagag tcaagttctc actatgttgt ccaggctggt cttgaaatcc tgggttccag	4980
caattctcct gcttagcctt acagagtgtc gggattgtag gcataggcca ctgcaccg	5040
ccttgggctg atatttat ttttctgaga actttcctgt gcgttgtagg atgtttggca	5100
atgtccctgg ccggccaggt gcagcggctc acacctgtaa tcccagcact ttgggaggct	5160
gaggtggcg gatcacttga ggctgggagt tcagaagaga ccagccaaca tgggtgaaacc	5220
ctgtctctac taaaaatata aaaattagcc ggggtgtggtg acacacatga gaatcacttg	5280
aactcaggag gctgagtttg ccgtgagctg agatcgcgct gctgtactcc agcctgggtg	5340
acaaagcaag aatctgtctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaattcg ctggtctcca	5400

ES 2 845 644 T3

cctacgtttg	tatccccacc	ccaagtcctg	acaataaaaa	atgtcttcaa	aatgttcctt	5460
gcaaaattgc	tcattgaggc	taactgaggt	ggctcacaaac	tttaatccca	gccctttgga	5520
aggctgaggc	tggcagatca	cttaagccca	ggtgactggc	cctggccaac	ttggcaaaac	5580
cctgtctcta	ctaagaatac	aaaaaatagc	cagacgtggg	ggtgcacacc	tgttaattcca	5640
gctactcggg	aggctgaggc	agcagaatca	cttgaacctg	ggaggcggag	gttgcagtga	5700
gccgagatcg	caccactcta	ctccagcctg	attgacagag	tgagactcca	tctcaaaaaa	5760
aaaagaaatt	actctctgag	caccagtgtg	ttacagtgtg	cttagctgtg	gtaccacttt	5820
ggattctttc	acacaagaac	agttaaggcc	agttttaaag	ctgtggggcc	atttctgaac	5880
tgtattttgt	tttttttttt	ttggagatga	agtttctactc	ttgttgctca	ggctggagt	5940
cgatggtgtg	atctcggtc	acttgcaacc	tccgcctccc	aggttcaagc	aatctcctgc	6000
cttagcctct	tgagtagact	tgattatggg	atcttggtc	actgcaacct	ctgcttccca	6060
ggttcaaaca	gttctgcctt	agcctgctga	gtagctggga	ttacagggtc	ccgccaccat	6120
gcttggttaa	ttttgtat	ttagtagaga	cgggggttca	ccatattggc	caggctggtc	6180
tcgaactctt	gaccttgtga	ttcaccacc	tctgcctccc	aaagtgtgtg	tattacaggc	6240
atgagccact	gtgcctagcc	aattttttga	attttttagta	gagatggggg	ttcatcatgt	6300
tggccaagct	ggtctcgaac	tccctgacctc	aggtgatcca	cccaccttgg	cctcctaaag	6360
ttctgggatt	acaggcgtga	gccacttcgc	ccagcctgca	ctgtgttctt	atcctgcata	6420
atgacttaaa	ttgataataa	gttgtgggtca	tggttctcag	aaacctaaaa	taattcactg	6480
atgttaataa	aaatgagtgg	ttgtatttag	agtcaaggcg	aaactgaatt	aggatgtata	6540
aaataacttt	tttttttttt	tttttttttt	aagtaggact	gttggttcggc	tgggcgtggg	6600
ggctcacgcc	tgtaatccca	gcactttggg	aggccacagc	gggcgggtcaa	aagtttgaga	6660
ccagcctgac	caacatggtg	aaaccctgtc	tctactaaaa	atacaaaaat	tagatggatg	6720
tggtggcgca	tgctgtaatc	ccagctactc	aggaggctga	agcaggagaa	tcacttgaac	6780
ccaggaggcg	gaggttgacg	tgagctgaga	tggcaccact	gcactccagc	ctgggcgaga	6840
gagtgaagct	ctgtctcaaa	aaaaaaaaaa	aagaaaagaa	aaaaaaagaa	aagggactat	6900
actatgttgc	aagagtgtag	tttctgtccc	atactgaatt	cactgttctt	tccctagtga	6960
ttaaaataca	agaaaaggta	gaggagagaa	cacgaactga	attttatgaa	cttaattcca	7020
agaatgtatt	tttacatttg	ttcaaaaaat	tattacttta	ttgataatat	gcaaacatac	7080
cagattatgt	attaatagtt	aaaaatttga	gttctagaac	aagcttatta	aaaatcaacg	7140
tcagtaaaaa	gaaaatagat	ggtagtcaca	gtgccattca	tctgaaaata	atgttttaat	7200
actcaacatg	tatatggatt	atatacttat	acgtttatag	tattgtagct	ggatttatgt	7260
tacattttta	gcataaaatt	tggcttttgc	tgggccagct	ggcttgcgac	tgtagtccca	7320

ES 2 845 644 T3

gcaactcagg agggtaaggt gggaggattg cttgaaccaa agagtttgag gctgcagtga	7380
gctgtgacct cacctctgca caccagcctg agtgacagag caagacccat ccctgaaaag	7440
aaaaaacttg gctgttttac tttgctttca atttgtagta tattctactt aatataataa	7500
acttactttc tgtgagggtgc ttgaatactt tttaatgggtt atttatgaag tgggtgaactg	7560
taattctgta tttgtacatt tggatgtaca aatagtgttg ctacagttgt ccttttttgg	7620
tatgtctcca gtgttccttag gataaattcc tgaaagtga tttcagtttt gaatttcaga	7680
gaaacatgtc aaagttcttc ttttaagcctt taagtctcct gatatgtttt gtcgtattgc	7740
agcttggaag ggttgaaata aaatcctcta ttagggctgg gtgcagtggc tcatgcctgt	7800
aatccgagca ctttgggatt tagctgattt ggctgattta tcatgccact gccacctgta	7860
tccacccaaa atccacaaaa accccaggat acattcttag cattaaaaaa aaagttatat	7920
aaatatatat aattatatat atatttgaga cagggcctgt ctctgatacc cagacgtgtg	7980
cagtatcttt caaaaatcat atatctatat atagtttgcc ccttccttca gtctttgctg	8040
cccctaatat ctgtccttaa tggttaccat ggtgaaactc ttggaaatca ttcaggggga	8100
aaaaaaattt gtgttgggat aggggaggga tgtcagcata agtttttaat acttgataaa	8160
tgattgcaa cagaatcaaa aacaccttgt tttctatctt ttttcacat ataattct	8220
tgagaataat ttcgtaacag cacttaacag atatacctta tttttcaaag aaggctgtgt	8280
agcattctat tttaaagtgt tttcacagta tatgagtctc ctattgatag gtatctgcat	8340
ttttgtcttt ttgatctagg gttgttttta aggcagttta aaaactatag taagtaaaag	8400
aggccagggtg cggtggctca cacctgtaaa ccagcactt tgggaggccg aggcgggtgg	8460
atcacttgag gtaggagttt gagaccagcc tggcaaacat ggtgaaaccc ttctctacta	8520
aaaatacaaa aaattagccg gccgtgggtg caagcgcctg tagtcccagc tgttcggaag	8580
gctgagggag gagaatcgct tgaactcggg aggcggagat tgcagtgagc caataatatg	8640
ctgctgtact ccagcctggg caacagagcg agactctatc tcaaaaataa atacaatttt	8700
aaataaaatt ataaaaataa agcagcaccc agctttattt tttatttatt tattttattt	8760
ttgagacaga gtgcgattct gtgcgtcaag ttggagtga gtggtgccat cttggctcac	8820
tgcaacctct gcctcccggg ttcaagtgat tctcccgtt cagcctccca ggtagctgag	8880
attacagggtg tgtgccacca cgcccagcta atttgtattt ttagtagaga tgggggtttc	8940
accatgtttg ccaggctggt cttgaactcc taacctcagg tgatccgcc accttgccct	9000
cccaaagtgc tgggtttata ggtgtgagcc gccgcgcttg gctcaacatc ttattgtttg	9060
agacggggtc tccttctgtt atccaagctg gagtgtagta gtgtgatctt acagctcact	9120
gcagcctcca actcttgggc tcaaatgatt ctctgtctc agcctcccaa gtagctagta	9180

ES 2 845 644 T3

ctacaggtgt	gcaccacccat	gccctgctgt	ttctttgttt	tttttatatg	gacagtcttg	9240
ctatgttgcc	caggctgggc	tcaaactcct	gagctcgagt	gattctgctg	cctcagctac	9300
tcaaagtgt	gggattgtag	gcgttaacta	tcagggttagg	cctgttctgt	ttttattagc	9360
gtggatgact	gctggttact	actggccggt	tgtatatcct	tgaattacct	ctttgttttt	9420
agccattttt	ctccatttgg	gtgctttttc	acagtgactt	ctgggaatat	tatgttcttt	9480
tcttttgatt	tacctttcaa	attttatttt	tatggatata	taatagtgtg	acgtgtacat	9540
tatatattct	tgaagagtta	ggcttattgg	gattccagcc	tttagtagtc	ccatgaaggt	9600
gagcaaaactg	aaatgtactt	actagtctta	gtcatttggg	tcgtaatatg	taatagaaat	9660
gggtgcttct	ctaaaagaaa	aatagaaaac	ttgaggggtga	aggatcagaa	attgaagaca	9720
gtaaatactg	catagagggt	taaatgctag	ggtttttagg	ttttcttttt	tttttgagat	9780
agtcttgctc	tgacacccag	gctggactgc	aacctctgtt	ccctggcctc	aagcgatcct	9840
cccaccttag	cctcctgact	agctgtgacc	acagatgtgc	accaccatgc	ccggctattt	9900
ttttttgtat	ttttggtaga	gatggggctc	cgccatgttg	cccagtccag	tgctggattt	9960
tcatatcaaa	acagggctct	gctacttact	tgctcttggt	acccaaatgg	caagttaggt	10020
ttgttttgta	tttgttttca	tctgcatcgg	ggtatatgtt	cacagctgga	tcagcaaaact	10080
ttctgtagta	aggtagggcc	tggtagtaaa	tatgtagtat	gctttgcaga	ctgcataggg	10140
tctctgtcat	atgttctttg	ttttctttac	agccttgaac	aaattaaaaa	acccagtctt	10200
cagccttgct	tgtagcataa	taaagaggaa	attaaaagtg	cttatgttat	acgtggtaca	10260
tactaaaatt	tattaagtgg	cgactggcag	tttaactaat	tgacattctc	ttgtgttagg	10320
ttaatacagg	ggttggcgta	ctatggcctc	agtcctaaatg	tggccactc	catgtttttg	10380
tataggctgt	gagctaagca	ttaagcatta	atttattact	taaatcaaca	aataaagttt	10440
atgtggtgta	caacatgatg	ttttgatgtg	tgtacattat	ggaatggcta	actcaagcta	10500
atattcatta	cttcacatac	tttttttttg	tggtgagaac	atttaaaatg	tactcttaat	10560
aattttcagg	tatacaatat	ttgtttttgt	ttttgttttt	gttttgagac	gaagtctcgc	10620
tcttgtcccc	aggctggagt	gcagtggcgc	tatcttggct	cactgcaacc	tccgcctccc	10680
aggtaacaagc	gattctcctg	cctcagcctc	ccaagtagct	gggattacag	gcgcctgtct	10740
ccacgcccgg	ctagttattg	tatttttagt	aaagacaggg	tttcaccatg	ttggccaggc	10800
tggtctcaaa	ctcctgacct	caggatgatcc	gcctgcctca	gcctcccaaa	gtgctgggat	10860
tacaggcgtg	agccaccggc	cccggtaca	atatgttctt	aattatagtc	agcaatagat	10920
ctcctgaact	tattcttccc	agcgtcttcc	caatcccacc	tccacccctc	gctaataatt	10980
aattttaaat	gactggggaa	aaaattgaaa	gaactgtttc	atgacacttg	aacattatat	11040
aaaattttca	tgtcagtgtt	cataaataca	aacttttatt	agaacatagc	catactattt	11100

ES 2 845 644 T3

atatattgaa atacagttga atttgtcata tgaccaatth attagtattg attaatgtgt	11160
tgagcagttt attcaagtgt ggttttgtgg aatgaaagag acaggaggga ttatgaggac	11220
tctccttagc aggattgatg catttcactt tttttgacag gaaggaaagt ttaggttcta	11280
ttttctcagc aactctactt aactgcctcc atctgaacta tatataggag ggggtggata	11340
tcagcaaaga ttaacatcag taaatthtga tgaattctct aaaaattctg atthtttaaag	11400
agggaattht ggctgggcac agtggctcac acctgtaatc ctaagcactt tgggaggcca	11460
aggcaggtgg atcacctgag gtctggagtt tgagaccagc ctggccaaca tggtgaaacc	11520
ctgtctctac taaaaacaaa ttagctgaat gtggtggcgc gcacctgtag tccagctcc	11580
ttgggaggct gaggtgggag aattgcctaa acccaggaga ggtggaggtt gcagtgagcc	11640
gagattgtgc cattgcactc catcctgggt gacagagcga gactctcaa aaaaaagggtg	11700
ggtgtgaatt ttgttatgtt gtgcgggctg gagtgtagt cccatccatt ggcacgatca	11760
tagagtacta cagctcccta actcccagac tcaagtgatt ctccctctc tgtctcccca	11820
gtagcaggaa ctacaggcct gtgccaccat gccagctth cttagtcttg agggactgca	11880
tttacaccta tgcctthtac tctagggtct tttattcata ttgctagaaa tttggagaag	11940
aaagaaaggc ataatctctg cagaaaagcc attatthctg cagatagttc tthttthttt	12000
tgagatggag tctthcttg tcaccaggc tggagtgcag tgggtgtatc taggctcact	12060
acaagctcca cctcctgggt tcacgccatt ctctgcctt agcctccga gtagtgggac	12120
tacaggcacc cgccaccatg ccagctaat tthttthtgt atthtttagt agagacgggg	12180
tttcaccatc ttagccagga tggctctgat ctctgacct tgtgatccgc cgacctggc	12240
cacccaaagt gctgggatta caggcatgag ccaccacatc cggccaatth ctgcggatag	12300
ttctaagctt tagthttgac cacgttggtt gcctatggcc aattcctgga ttatthtcat	12360
gtthccagac acagctatgt gaaagcaggg tthgtthtaa tagtgttht agcctthgat	12420
tccagttctg ctccactct tggctataa ggatccctat ggcagcaaca gaatggcca	12480
gccctcatga ttggttgctt aaaaaggctt taggatattc aaactgggtg gcctgtcttg	12540
tttggaatag gactaagcat gtcacactth caccatggaa gagttaatcc atattctatc	12600
tgtaatgtgt atctccagtc attggthttc aacaagtgt cctatcttag gaggagtgt	12660
atattagaac agtcttcca gagtaatth tthcattatt tcagatthtt tagthtttht	12720
tgtthgttht tthttthttt tthtttaaag gctctcactc tgtcaccag gctggagagc	12780
agtgatacga tcatagctca ctggaacctc tacctccctg ggctcagggtg atctccac	12840
ctcagccttc tgagthttctg ggactacagg catgaaccgt gaggcccagc taatthttgt	12900
gattthttgt tthttthtag agtcagggtt tctccatgtt gccaggctg gtctctact	12960

ES 2 845 644 T3

cctggtctca	agtaacctgc	ccgcctcggc	cttccaaagt	gctgggatta	gaggtgtgag	13020
ccaccacacc	tgtactacta	ctttagtttg	aacactatat	ttaaatctaa	taattcagac	13080
atggcccat	tcatacttga	cagaaagtat	gagtcaaaga	ctcaaatacat	tcagattctc	13140
acatatgtaa	aacgtacgct	tggccgggtg	cagtggctca	cgctgtaat	cccagcactt	13200
tgtgagacca	aggtggggcg	atcacctgag	gtcaggagtt	caagaccagc	ctgaccaaca	13260
tggagaaacc	ccgtctctac	taaaaataca	aaattagctg	gggtgggtggc	acatgcctgt	13320
aatcccagct	attcaggaag	ctgaggcagg	agaatcactt	gaacccggga	ggtggaggtt	13380
gtggtgagct	gagatcgcg	cattgcactc	cagcctgggc	aaaaagagcg	aaactctgtc	13440
tcaaaaaaaaa	aaaaaaaaagc	aggcttataa	aataaaacaa	aaatgtccct	tatgatttgt	13500
cttaaaggta	gttgaattaa	taagagctaa	atctagtgtc	ccatacatct	ttgtgtttct	13560
tactctaccc	tttagaaagg	gtgggggtgg	acgtggataa	ggcacacagt	taattcaggg	13620
acggtggagt	cttggctactt	gctctttttc	cctgaccttg	ctttggagtt	attttatttt	13680
ttaaattctg	catttggcat	gctattatca	cttgcttact	attataggtc	ctattttatc	13740
tgttgccatg	catattctca	tagtgcctaa	aatactctaa	aagctatttc	cagagggagc	13800
tttaattgaga	catacaatgc	ttaatctctc	aaatgtaaat	gtactagaac	aaagcattct	13860
ggggaagaaa	acagtgggtg	atttaactga	actcactttt	ccaaaacagt	ggcttttgat	13920
tttctgtaaa	cattgacttt	attaagcttt	tcccttgcta	ctatatgcac	tctctatttc	13980
ttaaattgca	aagagttatt	catgaaattt	gtgataaata	tttgaatcta	aggcaacgtt	14040
tttggtattct	ttatacgagg	tttttagcag	catgtgtaca	tgtatgtgat	agctgttaac	14100
ggaattcact	taagttttac	ttagaagcct	gggtagtaga	acctagaagt	tgcagtggga	14160
attttttttt	aatttgaaag	attaaatagg	taaaaagtca	tctttaatct	ctattaaact	14220
tttttgata	atgtcagaag	tgaaagttcc	ccacatctgc	ttacagcctg	tttgatccct	14280
tcctgacttg	attgattaaa	tggacatctc	tatatacata	tgcataata	ttcaattttt	14340
gcttagtaac	aaaaacaaaa	gttacacata	ctggtgacta	atttgctttt	ttcacgtatg	14400
tcatagaacca	ttttccaggg	cagttcatct	agatctccct	caattctttt	taatggctac	14460
atattccact	attatggatg	taccatattt	atacaaccgg	ttccctattg	atggacatat	14520
ggttggtgtct	agttttttgc	tagcattgtg	atagattaga	gcctgtaatg	aatggtaagg	14580
aagtaagtag	atgatagcac	tactactttg	aaggaaaaag	tagagaataa	acttcctttg	14640
ccatagtcac	ttactaaatg	gaatttaata	aaaacactgt	caaaagtggg	gaggaccaa	14700
attgatactt	tttctctgat	ctttttgcc	tgtgtatata	tgaattcttt	gtttttaaag	14760
aagaaacagc	attgaagcat	tatttggggg	gaaaaacaca	cacacaaaat	ccagcaactc	14820
agcattcatg	agcaactcta	tactatacca	gtatgtgcct	gtgcagtggg	aggaaaacaa	14880

ES 2 845 644 T3

ttttggttaag gattaaaaact ttagcttttaa acttccagca ggttgatatt ctaatgaatg	14940
ataaatcaaa aaaaaatfff aaatattctt gtattgacag tgcttttttt tttaaatcac	15000
cctaccttga tatctgtaat tttagtttaa actttcccat ttttctttaa agaaaaaaat	15060
ctgaatttgc agccaacaaa aattagatat cctaagggtg tattacttct gacttttatt	15120
aaaatatcaa catttcttag agatgtttat gggccgactt tgtctttttc ttcaaggggc	15180
caagttcact aattgctgag ttttatgcat atgacagcaa ccgtcctttt gtaggtgtgt	15240
gtcgcaccca tctagatact ttaaaatgct catctatttc atttttaaaa ttatgtgtgt	15300
gggattatca gtattttttt gttaaacata tgacatctgt agttttatttc actaatgtaa	15360
attttttcta ccatttgctt gatacaggaa atatatcctg gacaattcca gccatctctc	15420
tgtcacaaat tcatagcctt gtcagataag gaaggaaaac tacttgcgaa ctatacccag	15480
aacatagaca cgctggaaca ggttgcggga atccaaagga taattcagtg tcatggttag	15540
taaacttcag agtgggtttc tgtaatttat tttagtttta taggaagata tttcctataa	15600
agctgactgc catcgagaag tggagataaa gcattattta atcatgttat ctcatctatc	15660
gataacctca gaaaagtaga aaacaaaaat aataaaaaa gaagtattgg ccttgacagt	15720
taattataga aaacctcaga tattaatttg cttttgattt caaaagatgc tgcagttgca	15780
tgcattcaat tattttaaat aatcttttct ggctgagtgc agtggctcac gcctgtaatc	15840
ctagactttt gggaagccga ggcgggcaga tcccatgaag ccaagagttc gagaacagct	15900
tggccaacat ggtgaaatcc caactctact agaaatacta aaattagccg ggcaggttgg	15960
caggcgctg taatcccagc tactcaggag gctgaggcac gagaatcact tgaacctggg	16020
agttggaggt tgcagcgagc caagattgca ccattgcgct ccagcctggg agacagtgag	16080
actctgtcaa aaaaaaaaaa aaaaaagaaa aagaaattct gaatacaaga gtagtattag	16140
ctgttaatga agaaatgtga catctttagt ttatgaaact aaaagaactg gatagttgag	16200
atgtacagga ttcagagatt cagaaatggt taaaacaagt atcaacaggc cattaggtat	16260
ctaaagtgtt tctaagaact gccgagctaa ggtaatatagag ttggaactgt ccaactctgc	16320
aggatttttag ccctggagga gtgagctgtt acagttttgt tgaaaagagt agctttagaa	16380
ggcatcatta tattagtgtc tcagagattg agaatcatat tcattctatg tataaatata	16440
taaattcttc atcccctaga ttctcctgta gtatcacaca aaatctgcag tgtgttctga	16500
ggtttaaaat caaagttaaa acaaaaaaaca aaaatcctta aacctctta acatttgtga	16560
tgttaaaactt tataacgttt gtggtgtgtt caagaaacag aaatacttct ttaataaagc	16620
atataatatgt tgtttgtttt taggttctt tgcaacagca tcttgctga tttgtaaata	16680
caaagttgac tgtgaagctg tacgaggaga tatttttaat caggtaatth gttgcccata	16740

ES 2 845 644 T3

ttttaggaat	tgttcatgtc	tctgaagtat	ttcttctttt	gcctcaaaat	ccttttttac	16800
ccctttaaag	tatatatggt	acagaaagat	tcaggaagaa	aatagttagc	atttggaat	16860
tttggtaaaa	tacacgagaa	cctttcaata	ccttatatag	aaaacagccc	tataaaggct	16920
cttcaaatta	tgaaattggc	ttcttagtat	ctaagccgaa	cataaaatgt	cagatcataa	16980
gcaagttggt	gttgtagtag	tttttctcct	tcctctccct	ttttgtgcct	gtcagatttg	17040
gaccttaaat	tagttatggt	aatctaaaat	tatttcatac	atgttcattg	ccaaaaata	17100
taggaaaatt	tggcagaaaa	taaaaattat	ccagaaatat	gtcctgtgtg	cttagcaata	17160
tatggaggta	atcatgtcat	tacgaaagag	gaagaatagt	atattaaaa	ggagtcattg	17220
gtcgggtgca	gtggctcatg	cttgtaatcc	cagcactttg	ggaggacgag	gtgggtcgat	17280
catttgaggt	cagaagtgag	accagcctgg	ccaacatggc	aaaaccccg	ctctcttaaa	17340
aatacaaaaa	ttagcctggc	atggtggcat	atgcctttaa	tctcagctgc	ttgggaggct	17400
gaggcaggag	aattatttga	actcgggagg	tggaggttgt	agtgagctga	gatcatgcca	17460
cttcaactcca	ggctgggcaa	cagaacaaga	ctccatctca	aataaataaa	atggaatcat	17520
tttatttgac	aaatgtctat	ttttttttga	aaggatcaat	tcccatttag	tgtatataca	17580
cacattatgt	ttttctctct	aatatatgat	ggactcttca	atgtcaagtg	tttttctaca	17640
tagatattat	aacaagagca	tagtatttca	ttgtttcata	gtatgttaat	aaactaccca	17700
tcattgacag	ttgctgttta	tccatagcct	ttctgttttg	tttttttttt	aataattctg	17760
aaatgtattc	ttagaggat	ggaaatggtg	actatttcta	acttgggctt	actctttgct	17820
tctctacctc	aaccaaatac	tgaaaatatg	taggtagttc	ctcgatgtcc	taggtgcccc	17880
gctgatgaac	cgcttgctat	catgaaacca	gagattgtgt	tttttggtga	aaatttacca	17940
gaacagtttc	atagagccat	gaagtatgac	aaagatgaag	ttgacctcct	cattgttatt	18000
gggtcttccc	tcaaagtaag	accagtagca	ctaattccaa	gtaagttggt	gatgggtttt	18060
ggagaacatt	tctatatata	atgtcatggg	ttgtgggtct	gtataataga	cgctagtaat	18120
cttaactctg	cttctgtttg	aaagagtggg	gaagagctaa	ttttagaaat	tgtttgtttg	18180
tttgtttatt	gagatggagt	ttccctcttg	ttgcccaggc	tggagtgcag	tcgcatactc	18240
tggctcactg	caacctccgc	ctcccgggtt	caagcgattc	ttctgcctca	gccttctgag	18300
tagctgggat	cacaggcgtc	caccaacatg	cctggctagt	ttttgtattt	ttagtataga	18360
ccgggtttca	ccatgttggc	caggctggtc	togaactcct	cagctcaggt	gatccgcctg	18420
tctctgcctt	ctaaagtgct	gggattacag	gcattgagccc	ccatgcctgg	ccagaaattc	18480
tttattttta	gtagagatga	ggtcttggtg	tgttgcccag	gctggattcg	aactcctggg	18540
ctcaagtgat	cctcctgcct	cagccccttg	agtagctagg	attacaggca	cgagcctcca	18600
catctggctg	aactgttttt	ttaggtggca	ttgttcattg	agactggtga	atctgacatt	18660

ES 2 845 644 T3

ttgatggggg	gtggagggtt	gtcaaaacgc	aagtaatggt	ggtggctcgt	gcctgtaatc	18720
tcagcacttt	gggaggccga	ggtaggtgga	tcgcttgagg	gcagcagttt	gagaccagcc	18780
tggccaacat	ggtgaaaccc	tgtctctact	aaaaatacaa	aaattagctg	ggcatagtgg	18840
tgtgcacatg	tagtcccagc	tacttgggag	gttggggcat	gagaatcgct	tgaactcagg	18900
aggcagaggt	tgcaatgagc	cgagaatgtg	ccactgcact	ccagcctggg	tgacagagtg	18960
ggactctgtc	tcaaaaaatc	aaaaacaaac	ccagaagtaa	tgctaaactc	tacttctaata	19020
ttatgtgaaa	aattaagaca	aaggtagagt	tcaacttaga	cttttttggtg	gaatgtgttt	19080
ttaatgttgc	aagggttagc	atcaattaat	ttatgaaatg	gtcctttatc	cttatatttt	19140
ttgattacag	ttttgatctt	tcaaatttaa	ttgatttcac	atttaataaa	ttcaaagtga	19200
tagtttggtg	gaagtgtaac	ataccatgta	agatggaatt	tgggggctca	gaatgattgg	19260
ttcattcttg	tagtaacagc	catgccataa	cggtgatatg	tcgatatagt	ttacccaaaa	19320
gggtgtgtat	ataaaagtgt	tcacataaaa	tttaaactct	tattactctc	aggaaaattt	19380
ctttgtcata	tatattctca	tactgtctgt	ttcctcctct	agtttagaat	cagaggagga	19440
gagagagaga	tttcagttgc	atcagatgtg	tcctttcata	agtgagggaa	agaggagagg	19500
aaaaatatta	aatccctagc	cagagaattg	aattagaccc	cacatcagca	gtcaaggcag	19560
ccagagtaaa	cagttggaag	aaacatggag	tcaagctctt	caattttggtg	tctatcccat	19620
atctcgtggc	tttagcagtt	aactcagctc	tacctaatta	gctgtgaaat	tctgttaaag	19680
tagaatacaa	gacaatttgc	aattaaatga	aacatgaaaa	tttaataatac	aaatctcttt	19740
gttcttgagt	tgctcttctt	aaagcaaaat	caaaggcact	ctgcttaaaa	gcttttcttt	19800
ttatttttta	gagacgggtg	tcttgctgta	gctcaggcta	gagtgcagtg	gtgcagtttc	19860
agctcactgc	agccttcaac	tcctggggac	aagcagctct	tcacttcag	cttcctgagt	19920
agttaggacc	agaggcgac	accatgcttg	gcaaattttt	aaattttttt	ttgtagaaac	19980
gggattcact	ttgttgccca	ggctggtcac	aaactcctgg	cctcaagtga	tccttcctcc	20040
tctgcctctc	aaagcattag	gattacaggc	atgagctacc	atgcctggtc	cttaaaaaact	20100
tttctttcaa	aagctttctg	tgggatagta	tgatgtgttg	caaagataat	taaaaaaaga	20160
aacagggtta	taatagcgta	gaatatgttt	atatgacttt	ttccctcccc	ccctccctcc	20220
cctccctccc	ttccgtttgt	ccttccttcc	attcatcctt	ccttctgtta	gtccttcctt	20280
ctgtccatcc	ttcccgccg	ttcttccttc	cttccttcgt	ccatccttct	gtctgtcctt	20340
ccttcctgtc	atctgtccgt	ccttccttcc	tcccaccctc	cctccctccc	tcctatcctc	20400
cctccctccc	tcattgcccc	ggctggagtg	caatggcatg	atctcggctc	actgcagtct	20460
cccgtgttca	agcagttctc	ctcccaagta	gttgggatta	gaggcatgcg	ctaccacacg	20520

ES 2 845 644 T3

cccggttaat	tttgtgtttt	tagtagagat	ggggtttcac	catgttggtc	gggttggtct	20580
tgaactcctg	acctcaggtg	atccgcctgc	ctcggcctcc	caaagtgcctg	ggattacagg	20640
cgtgagccac	tgtacccagc	tcaccttctt	tatatcagga	gctacttaag	tagaacattt	20700
atgtaccaag	aactcttctg	tgcacttgac	taactcattt	aatcctcacc	acagtcttgt	20760
ggagaagtac	tattatcatc	cccattctgc	agacaaggaa	atttgaggtt	cagagtggga	20820
aagtctggga	agattgctca	ggggtaacca	ggtgatagga	gcagaacttg	agcgttttat	20880
aaaagacact	taactgcccc	tctgcttgct	tgatgaaatg	taatggcttg	gttaagtatt	20940
tagtgcattg	gtcttttttg	ggaatttgga	gctcaagccc	ttgttggtt	tttgcataat	21000
gtatctgttg	tgggttttatt	agcttacttc	ctcctccctt	tttctaactc	ttatttttca	21060
ccctatttta	ggttccatac	cccatgaagt	gcctcagata	ttaattaata	gagaaccttt	21120
gcctcatctg	cattttgatg	tagagcttct	tggagactgt	gatgtcataa	ttaatgaatt	21180
gtgtcatagg	ttaggtgggtg	aatatgccc	actttgctgt	aacctgttaa	agctttcaga	21240
aattactgaa	aaacctccac	gaacacaaaa	agaattggct	tatttgtcag	agttgccacc	21300
cacacctctt	catgtttcag	aagactcaag	ttcaccagaa	agaacttcac	caccagattc	21360
ttcagtgtt	gtcacacttt	tagaccaagc	agctaagagt	aatgatgatt	tagatgtgtc	21420
tgaatcaaaa	ggttgtatgg	aagaaaaacc	acaggaagta	caaacttcta	ggaatgttga	21480
aagtattgct	gaacagatgg	aaaatccgga	tttgaagaat	gttggttcta	gtactgggga	21540
gaaaaatgaa	agaacttcag	tggctggaac	agtgagaaaa	tgctggccta	atagagtggc	21600
aaaggagcag	attagtaggc	ggcttgatgg	taagaaaggc	agtcggacca	ttttgaaagt	21660
ataaatgtca	taacagtatt	tccaaaaaat	tagctatttc	ggcagggttaa	tcgataggg	21720
agctttatgt	agttgattct	gtttagagaa	actgtacagt	tcgtaatcag	aaaggtaaat	21780
cttctgggtat	cttaacatga	tatggagaag	gaagtgttta	atagtgtctc	gtatgttgtg	21840
tttctctagg	ggatggaaaa	ataagaatgg	gttatttagct	ggcagaaatg	atgacagatt	21900
tgagtgttta	ctgtaggtca	gctgctttac	atatgttacc	tgattttaat	ctgaggtagg	21960
aactattact	cttcttcagg	tgggaaaact	caggaccata	gaggttaaat	acctcatgca	22020
cagtaactac	taagaagtgg	aagaaccaga	ttaaaatcca	gtctatttat	gcttagagcc	22080
tgccccctta	actactatgc	ggtgttgtct	cagatgtaga	acacatcttt	gttttctctg	22140
aggacttaga	aaaaacacgc	gtgattcttc	tccactgaat	ataggaatag	tttctaccct	22200
gtttagaaca	tgcatagtct	ttatcaataa	gtgttaactg	acatgtgaaa	tcactttcta	22260
ctctttggaa	gccgatgttt	taagtccaag	tagtctgtat	ggtggaaatt	cctaacttat	22320
gttaaaaaaa	agaaaaccac	tgtaacttag	ctataacagt	cttatataac	ttagaacttt	22380
aagtctcatt	ccatttacca	tacttggcga	aaactgacaa	attttagaca	actgtatttg	22440

ES 2 845 644 T3

agtattccag tcatttgctg taaatacatt ttagttcagt tgaataaacc tttggccttt	22500
ttcatattag gcaactgtgt aagttatgga gacacagtga ttaatgttgt gtataattat	22560
aaatgtgagt gataactcatt aatacttttg tatagggtgct gctgaagaac aaagtacttt	22620
attattgttt tgaacaaaac atcacacaaa aggtagattt tttttttttt tttttttttt	22680
tttttttggtg acggagtctc actctgtcgc ccaggctgga gtgcagtggc acgatctcag	22740
ctcactgcaa cctctgcgtc ccaggttcaa gagattctcc tgcctcagcc ttctgagtag	22800
ctgaaattac aggcattgcgc caccttgctc ggctgattct tgtattttta gtagagacgg	22860
ggtttcgcga tgttggtcag gctggtctca aactcctgac cccatgatcc atccacctcg	22920
gcctcccaaa gtgctggaat tacaggcgtg agccacggcg cccagcccca aaaggtagat	22980
tctacttgga gattagatta cagaaggctt tctaaggagc aaaatattta acaataagta	23040
gggatttaaa aagagcagac gtgttcacag gggaaactag aaaaagcata gagggatgct	23100
tacgtttgca aatcgtggca gaagtcagaa agtagaaaaa ttgctactga cttagatata	23160
cagttgtctc tagcgtatac aaagtctacc tatgcactaa gacttgcaact gggaactttt	23220
cttgaatgtc attttgacag atgtgtcaaa cggacaatct ctttgcccag gaaacagagt	23280
taacctggaa cagtcatttt tttttaaatt tatttatttt ttgagacgga gttttgctct	23340
tgttgtccag gctgaagtac aatggtgtga tctcggttca cggcaacctc cgcctcccgg	23400
gttcaagcga ttctcctgcc tcaactctca gagtagctgt agctgagacc acaggcgcac	23460
gccctcatgc tcagctattt tttttttttt ttttttttagt ttttgtagaa acaaggtctt	23520
gccacattgc ccaggctgat accaaaactcc tgggctcaag cagtctgcca gccttggcct	23580
cccaaagtgc tgggattaca ggtgtaagcc actgtgccct gcctgtggtg tcttgggaaa	23640
ctcatgagta ctatgtgtct gttgtaatag agggaaataa gtgggttttca cagtgatttg	23700
tagtggactg tgaaatttta gggattcagg tcagagttgt cacacagggt gtagtcaggg	23760
tgagaactgg gtcattgatgc agtatgaaaa agttcgagag ccactttgga gagaacttga	23820
gataggccac ctaccagtgt ggtaaccagg cttttgagaa ttcgtctggg atacggtaca	23880
ataaatacta catctattat gtgtgaagag atgttaagtt agggacatac tgtgaattca	23940
aggatagaaa acttttccat cagtttttag ggatcctact ctttcactta aaccccaaat	24000
ggccaagcta ggattgattt ggtgtgctgt agaaagaact tcattggtat tcatggattc	24060
acattacatc ttagaggagt tttcaaaagc gtcttagact gtatgtgtat atacacacac	24120
attctgaagc agtaggtggg tcttggggcc tgagatctcg ggtgaatgta aatttagggt	24180
cacagggtgat actgtagatt cacagtgtct acagagtaca ctatgaattt gtggtgacta	24240
cattattgac aaaatatttt aggtttataa tcagaaaaaa gttaaaatag ttaatgaaga	24300

ES 2 845 644 T3

tgctttaaaa	gcctgtgtac	tttagagaag	ctacttaaca	caaattgggt	atctaata	24360
ggctgggctg	gatacttcat	tttcatcaaa	tcttttttaa	ataattggtg	aaataacctt	24420
tattgaatat	ggttttctac	atttttcaca	cttccctcct	tcatagggtt	gtgaaaattt	24480
atttcatatt	ctagatgagg	aaattgaggc	acagaggtag	acttacaaa	atacaataaa	24540
tggcagaact	aagatttgaa	cccaggacta	agtgtattgc	ttgtatttat	ttaattaatt	24600
aatttttaag	agacagggcc	tcactctggt	gcctaggctg	gcccttgaa	tcctgggctc	24660
aagcagtcca	cctgcctcag	cctcctgagt	agctgggact	gcaggcacac	catgcctccc	24720
agttgttttt	aaacactaat	agtagtcttt	cataaggaca	cttataataa	aggcagagct	24780
ggaaccacac	cttcattcca	gactgctcag	actgagttag	tgtagaaaa	ctgaaagtaa	24840
catttttatt	actgtatttc	aggtaatcag	tatctgtttt	tgccaccaa	tcgttacatt	24900
ttccatggcg	ctgagggtata	ttcagactct	gaagatgacg	tcttatcctc	tagttcttgt	24960
ggcagtaaca	gtgatagtgg	gacatgccag	agtccaagtt	tagaagaacc	catggaggat	25020
gaaagtgaac	ttgaagaatt	ctacaatggc	ttagaagatg	agcctgatgt	tccagagaga	25080
gctggaggag	ctggatttgg	gactgatgga	gatgatcaag	aggcaattaa	tgaagctata	25140
tctgtgaaac	aggaagtaac	agacatgaac	tatccatcaa	acaaatcata	gtgtaataat	25200
tgtgcaggta	caggaattgt	tccaccagca	ttaggaactt	tagcatgtca	aatgaatgt	25260
ttacttgtga	actcgataga	gcaaggaaac	cagaaagggt	taatatttat	aggttggtaa	25320
aatagattgt	ttttcatgga	taatttttaa	cttcattatt	tctgtacttg	tacaaactca	25380
acactaactt	tttttttttt	aaaaaaaaa	aggtactaag	tatcttcaat	cagctgttgg	25440
tcaagactaa	ctttctttta	aaggttcatt	tgtatgataa	attcatatgt	gtatatataa	25500
ttttttttgt	tttgtctagt	gagtttcaac	attttttaag	ttttcaaaaa	gccatcgga	25560
tgttaaatta	atgtaaaggg	aacagcta	ctagaccaa	gaatggtatt	ttcacttttc	25620
tttgtaacat	tgaatgggtt	gaagtactca	aaatctgtta	cgctaaactt	ttgattcttt	25680
aacacaatta	tttttaaa	ctggcatttt	ccaaaactgt	ggcagcta	tttttaaaat	25740
ctcaaatgac	atgcagtgtg	agtagaagga	agtcaacaat	atgtggggag	agcactcggt	25800
tgtctttact	tttaaaagta	atacttgggt	ctaagaattt	caggattatt	gtatttacgt	25860
tcaaatgaag	atggcttttg	tacttcctgt	ggacatgtag	caatgtctat	attggctcat	25920
aaaactaacc	tgaaaaacaa	ataaatgctt	tggaaatggt	tcagttgctt	tagaaacatt	25980
agtgcctgcc	tggatccctt	tagttttgaa	atatttgcca	ttgttgttta	aatacctatc	26040
actgtggtag	agcttgcat	gatcttttcc	acaagtatta	aactgccaaa	atgtgaatat	26100
gcaaagcctt	tctgaatcta	taataatggt	acttctactg	gggagagtgt	aatattttgg	26160
actgctgttt	tccattaatg	aggagagcaa	caggcccttg	attatacagt	tccaaagtaa	26220

ES 2 845 644 T3

taagatgtta attgtaattc agccagaaag tacatgtctc ccattgggag gatttggtgt	26280
taaataccaa actgctagcc ctagtattat ggagatgaac atgatgatgt aacttgtaat	26340
agcagaatag ttaatgaatg aaactagttc ttataattta tctttattta aaagcttagc	26400
ctgccttaaa actagagatc aactttctca gctgcaaaag cttctagtct ttcaagaagt	26460
tcatacttta tgaaattgca cagtaagcat ttatttttca gaccattttt gaacatcact	26520
cctaaattaa taaagtattc ctctgttgct ttagtattta ttacaataaa aagggtttga	26580
aatatagctg ttctttatgc ataaaacacc cagctaggac cattactgcc agagaaaaaa	26640
atcgtattga atggccattt ccctacttat aagatgtctc aatctgaatt tatttggtta	26700
cactaaagaa tgcagtatat ttagttttcc atttgcata tgtttgtgtg ctatagatga	26760
tattttaaat tgaaaagttt gttttaaatt atttttacag tgaagactgt tttcagctct	26820
ttttatattg tacatagtct tttatgtaat ttactggcat atgttttgta gactgtttta	26880
tgactggata tcttccttca acttttgaaa taaaaacca gtgtttttta cttgtacact	26940
gttttaaaagt ctattaaaat tgtcatttga cttttttctg ttaa	26984

<210> 4

<211> 20029

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 4

gccagtgcg cgcgctcgagc ggagcagagg aggcgagggc ggagggccag agaggcagtt	60
ggaagatggc ggacgaggtg gcgctcgccc ttacggccgc cggtcccct tccgcggcgg	120
ccgccatgga ggccgcgtcg cagccggcgg acgagccgct ccgcaagagg ccccgccgag	180
acgggcctgg cctcgggcgc agccgggcgc agccgagcgc agcagtggcg ccggcgccg	240
cggggtgtga ggccggcagc gcccgggccc cggcgccgct gtggcgagg gcgccagggg	300
cggcgccgag cgccggcagg gaggccccg cgacggccgt ggccggggac ggagacaatg	360
ggtccggcct gcggcgagg cagagggcgg ctgacgactt cgacgacgac gagggcgagg	420
aggaggacga ggcggcgggc gcagcgccgg cggcagcgat cggctaccga ggtgagtcg	480
cgcgcgctgc cgcgcagccg cgtccctccg cgtccccgcc tgtgaccggt tcccaggttg	540
cccaggggcc cgagagctcc gcgggctccg cggcgggcgc ggccggcagc gcgcagctcg	600
gccctggctc ggccgcgcgc cgcgagctc gccggccctg ctgcggagcc gcgcgcggac	660
tcgccgctcg cctggggcgc cttgcgctgc tgcgcgcagt cgccgggacc gcggttctcg	720
cagtttgggc ttagagtga gttttccctc cctcggtttg gtttccctcc cgatgcgcct	780
ttagtgaaat tatagttttc ctcactgcac actttgcttt gcgacttttg ggctgtccc	840
tgatcgaca tgcgatttcg ttttgcaaac tgacacctgt gttgcttttt tttttttttt	900

ES 2 845 644 T3

tcttttttgg atagacctat gtcttttttt gaagttagaa attttaatac accaaagcta	960
tttcttgaga cacagtctaa aaaatgtaag gaaatggcta ttcctaaaaa tggtgctttt	1020
ctgcgattgc atttatcact tcgatataga ggagttatag ttgtactgta ctttcgtaag	1080
ttttcttttc ctttcaaaat catgctcgca acatttttag attaacaac ctgaaacaaa	1140
cctgcttggg tttgcctat tgacgcaaaa cgtttgggtt acttttttgt tttgtttttg	1200
taataatgcc acttatcgtc ttcctgaaaa gctttgtaca gaatttatca gagtctgtca	1260
gtgcccttgt agatgtttgt ggctcgata atggtgccat gaattaaaaa acaacaaaac	1320
gtgttaggga ctgaaatagg aaatgaccct tgatgtcagg tattaaggga gaaacaagtc	1380
gcataaagta tgcttcgtgt tctttaaatc atacatttac taacacccag tggctgaagc	1440
aggtagattg ctacttgaaa gggctacgga aagagacttt ctctggtttg ggcagtgaga	1500
acacagccag ggattgattt ttatctcagt gatatttaga agtaatttct atttgatgca	1560
tttcatgaag ttgtatttct ttgtcctggg catggaaccc tgagctgctt ttgtagggct	1620
acacagattt tatttgtgtg tgtgtgtgtg tgtcttcatt ttggattttt tgaggtaggg	1680
tccctgttta gccaggtg gtccggaact cactatttta tataatgtcag gctggtttcc	1740
aatgtctgtg ccttcaggt gctggagtta cagatgtgtg tgcttctgtg cctttctggt	1800
tttttgtttt tgtctcaaga acctgtgtgt gtctcacat acaggccaaa cgggcctcaa	1860
agtacctggg attgcagtg tggaccgcag ggccagctg gggattgtct gagccgcagc	1920
cttttgatct ctttgacaga caacctctg ttgaccgatg gactcctcac taatggcttt	1980
cattcctgtg aaagtgatga cgatgacaga acgtcacacg ccagctctag tgactggact	2040
ccgcggccgc ggataggtat gcttcaggca tgtgcatctt tgaaacaatt gcaaacttcc	2100
ttcattcctt ccgtccttct gtccgtcctt cctttttgag acaagatatt ttatagccca	2160
agctagttaa gctactctgc agtctctgcc cagcctctgg agtacatcac aaccaaagct	2220
ctttttgact tactcttctt tctctctttt cttgattttt tttttttttt tttttgacat	2280
tttcatctat cctatgatgg ctttaaaactt gtggagtcta ggatgtaagg atgacattga	2340
tatcctgact ttaccagcag tccagagtgc tgggattata ggtgtgctgt atgtaccatg	2400
tccgtttgtc agtgcctgag gttaggtcct cacctctttt cttctgtaca ttgtttttgc	2460
tttctgtgta cagcctttgg gggttttgct tgcttgtttt gttgtgggtg ttgtcgttcg	2520
tctgcttgct gtgtgagaca ggaacacgta tagcctagac tggcttgaac tcattggctg	2580
ggtagccagc cagcacatat tagccttgaa tttctgatct tgtgtctaaa tgctggggat	2640
tatagttatt tggtaccacc ccaacagctg cttttgtacc aactttaaat tctctgtcac	2700
ctttaccatt tagatttagt tgctcaggta ttggtaagat tttttttttc ttggcctcct	2760

ES 2 845 644 T3

gcatggtaat ccttgagtcg ctcaccacgt cctcccatct aaggcagtcga gaatacctag	2820
acagtccagg cagtagtggc aggcaccttt aatcctagca ctcaggaggc agaggcagga	2880
gaatcttgag ttctaggcca gcctgatcta cagagcaagt tccaggagag ccagggttac	2940
acagaaaccc tgtccccaac caaccaacca aaaaaacccc ttagacttaa gcacaccctc	3000
cccaaactga attagtcaga tcttgtagg gatatgacat gaaatacata taaattgtat	3060
tctttgcata aaaatgtata tattgctaac tcattgcttg aaaaaatagc tttttattag	3120
aagtgggaatt gatgtgagtc tttcttccct taatataggt ccatatactt ttgttcagca	3180
acatctcatg attggcaccg atcctcgaac aattcttaaa gatttattac cagaaacaat	3240
tcctccacct gagctggatg atatgacgct gtggcagatt gttattaata tcctttcaga	3300
accaccaaag cggaaaaaaa gaaaagatat caatacaatt gaagatgctg tgaagttact	3360
gcaggagtgt aaaaagataa tagttctgac tggagctggg gtatgtaaga cgcagaaaaa	3420
cagtaaagag aaagctagta gatattcctt ttccagctaa ctttttctgc tcttgatgta	3480
gcctttgttc ataaaaactg aagagagcct catttggtta actagttcag tgttttgaaa	3540
agtttgacaa ctttaagat ttgtatattt atagaacaat tggtaagtgg aattatggtt	3600
tatttttttg tttttattta agatcgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgagagagag	3660
agagagagag agagagagag agagaaacag actcattcat tcattgattt ttgcctacat	3720
gcataaatgt gcatggtacc cacagaggcc agaaatgggt gttgggttcc cagggtttg	3780
agttagtcag atgtaggcca ccatgtggat gctagcaaac ctggattcct ttcaaggagc	3840
agcaagttct ctttagtggc tagactctct agctcctgga cttgtttgggt tttaatttta	3900
tgtatatgga tgttttatct atatgtatgt ttttgtacca ttgtgtgatg tgcccaagga	3960
gtccagaggc atcagatccc ctgaaactgg agtgatgatg tttgtgagcc tcccaagtcc	4020
tctgcaagag cctcaagcct ctttcaaacc tggaattttt acacattata tgctggctcc	4080
taaagatgat ttagaagaat tagagctttt tgaagtctat ggtagcaaga gtctagtgga	4140
gaaagttttc tttcattctt ttttaaagat ttatttatta aaatgagtac actgttgctg	4200
tactgatggt tgtgagcctt catgtgggtg ctgggaatga aagttgctca ctcagggtcaa	4260
ccccgctggc tctggcctaa agatttatta ttatatctaa gtacactgta gctatattca	4320
gacgcaccag aagaggacgt ccaatctctt tatgggtagt tgtgagctcc atgtggttgc	4380
tgggatttga actcaggacc tttggaagtg taattgtact cttaaccgct gagccccctg	4440
ccctccttca ttttaccttt gtaagattgt agagacttgg tctagaacca agtcatactg	4500
tgttgtgttg tatgttaggc attatgttag caaccagagc agtttgaaca gagtgaanaag	4560
tatgaatgaa tcagaatctc agttgtggga ggcagaggca ggtgagcatg ccaaagcagg	4620
tcggtgtgtg ctggccccctc agccccagac gagggctagg gttgcttcag gtgtgattta	4680

ES 2 845 644 T3

gactaggggtt cgctctttat ttttattttt atttatttat tttttttatt tttagggaca	4740
aacattaagt tttgtgtttg ggtgcgtgca tgtgggtggtt tgtgagctat agcactgtgg	4800
gagtcagtac accctgagtt gtgagttgct tgtccttcct cactgtcagt cttggctcca	4860
ggcttcatca gaagcacctt aactggctga gctattctgt agggcccccag ttttagttat	4920
tcttgaaacg ggcttactca cagccctgga tggcctggaa cttggcagag atcctcccaa	4980
ctattgggat tatttcaggt atgtactacc atgcctggct ttattttttt tgagacggtc	5040
tctatagttt aggatggttt caaacttgca gcagtccttc tgtttcagaa aaattgggat	5100
taggagtata tagcaggaga caatctgttt gttttgttcc aagtgaatg gatctgtaaa	5160
actggaatgg aagaaagctt gtccattccc ctatcgggag tgtcaagatt tatctacaga	5220
aacgggtatt gtcttaattt atttggagac aggattatac tatgtagctc tggctggcct	5280
agaacttcct ttgtagacca ggctggcctc aaacttgtag agatccagtc ctattctggc	5340
tcccaaatgc aaagattaaa ggccagtgcc atcatacctg gttattaaaa aaattttgtg	5400
tagccatgtg tagtaacaca tgcttttaat tctagcactt gggaggcaga gactggtgaa	5460
tctgtgagtt ggaggccagc ctggtctaca gagcaagttc caggacagcc agggctcaca	5520
gagaaagcct gtcttgaaaa cctcccaatt tttttgtttt cttgtgtggt gtgtatatgt	5580
gggtatgcac gcacatgagt gtgtcagagg acaacttgca agtattacat gtggtcatcc	5640
agtacggtag ccttttagctg ctgagacatc tcaactggccc tttgttgtaa tttattattt	5700
tcactgcttg agcctggaca gacactctac agttgacctc tccttagccc tttttaggtt	5760
ccttaggggtg gctacctgaa cttaaaagat cctgcctcag ctatcttagc tctgactata	5820
aacttgtgcc actgtcctgg gttttatcat tataatttat aattaaatgc atatccttag	5880
ctggctatgg tgatgcattt tctgttatcc cagcatttgc ctttcagggc cttagtgact	5940
gtaacctcag cattaggatg tagacacagg cagatccctg gagcccaatg gctaccagc	6000
ctaactaaag acactatctc aatgagaatc gaggtggccc atgccactag ttctagaggc	6060
aggtaggtgt gtgtgtgtgt ttgtgtttgt gtttgtgtgt ttgtagttag accatgtcaa	6120
acaaaagaca aaaattaagc tattaataag taagtaaatg attcattctt gggctagaga	6180
gatgacttag aatttaagag gtcttactat aaggccaggg gccagattc agttcccagt	6240
acccatatgg caattcacia ctgcatgatt gatgcattct gacctccgtg gacaccaggc	6300
acctgtgtag aacacatata catgtaggct tccctatgtt catataaaat aataaagcct	6360
aatggcttct gaaaaaaaaa aaaaccaaac aaaccaca aactttgctg tgatatgtgt	6420
aaggtagttc taactcctgg acaacataac aaagatccca aacccttttt tgagaatgat	6480
tttgctgctg tgattgtccc caggtagtct tggaaatcag agcccaaaca gcccttcagt	6540

ES 2 845 644 T3

ctccctgagt atctgagact ttaagcatga accagtgtgc tcagtctata atacagtatt	6600
gaataaagtt tcaaaacttg agtattcttg aggtagtaaa gctgcctatg tgaggtcagt	6660
ttggaatgat tggtaaaaag ttgtacctac ttttttggtta aaaaatgaaa ttgagctggg	6720
tgtggtggcg cacaccttta atcccagcac tcgggaggca ggggcaggcg gatttctgag	6780
ttcgaggcca gcctggtcta caaagtgaga aagtgagttc taggacaggc agggctataa	6840
agagaaaccc tgtctcgaaa aaccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaagattta ttccaaccaa	6900
ttgtatttgt ttttaatttgt ttaaagtctc aaagggttaa gattagccca ttaaagcagt	6960
atgtggcaga ttttaattata cttatttacg tattttacct gtatttgaaa ttagaaagct	7020
tgtggtgttt ctgttcaaac ttgtattttt catctcttcc cactaaattg tatgtagtaa	7080
aggtaacttac tgtgaaggta gacagttaat gggttgactt aggtcctgtc tgtttcaggt	7140
ttctgtctcc tgtgggattc ctgacttcag atcaagagac ggtatctatg ctgcgcttgc	7200
ggtggacttc ccagacctcc cagacctca agccatgttt gatattgagt attttagaaa	7260
agaccaaga ccattcttca agtttgcaa ggtatcacac gtttttgtct ttatgataaa	7320
gagttctcac gtgtaggctt ttttaagttta cattcattgc ccagtgattt ggaggctacc	7380
agtgtggtag ttagaactta agttgttttag gactgatttt aaataatgta attttggtct	7440
tttgctgtg tgtcttgccc tctcctttgg aagttttag atctgaaaaa aaaaagaaag	7500
acttgttttc acttactctt ttttttctga atcataaagg ttctatgact actatgtggt	7560
atgttttata atggacaggt cttaatatat gcatatgtct aaaatgattt ttaataactc	7620
aaggttgaga ttacatgttt tgggaaacat tacaaggagc gtctttctag ttgataagtc	7680
agtcaccacc atgtgactgc atgtggctat tgaatgtgtg taatgacaca gtgagggcat	7740
gcttacttaa ggatttttaa tactttgcta aagaaaagtg aaatatacta attgtactta	7800
ttaaatacta acaagcaaac atttttatgt ttgggactat gttcaggagc caggcataat	7860
aatacaagtc ctgcagctcc gggatttcag gggcacagga tacttcatga cctgccaggg	7920
agggtacat catgagactc agcttcaaaa acaaagcagt agcaattttt tattaggcat	7980
ttgaaaattt cactttcatg tgaactaaag aaattgaaca cttggctcct atgtctgctg	8040
tgcagctctg ctctgctgta gaatataaag tttatataaa ttgtctcaag attttagtca	8100
ctagaaactt tgcaaggttt tatttgtttt gtttctttgt ttttttgttt tttttttcca	8160
gtttaatctt aaggtttttt gttttgaggc agtctgatgt aggccaggcc ggtcttgaat	8220
tttgcttagc catggctttt gaatttcctg agcctcctgc gtctaactcc catctgttgg	8280
gattagagca ggagctgcta tgcctggctg ttatgttcac tgtagggaa cttggaaata	8340
catatgcaag gcttttctga tttagagaga tgtttttagag acgtctttta aagtttcatc	8400
tgtggagggg tggagtgggt aatgggtgtg cactcccaag tgcaccggtg gatgtgacag	8460

ES 2 845 644 T3

cactacctta gtttagggg ttgggttccc ccacatcaca cgagagttcc tggattagaa	8520
ctcaggtcag cagattaggc aacagactta tctcccaatc cacctcccat cttgtaagcc	8580
ctaaggtgga ttagaaaggc tgtcttcctt cagtacagtc tcagaactgt aagggtgctt	8640
tagttcttgt ctccgtatcc tgggtgctggg attagaggat ggccagactt tgcagctaag	8700
gtgtactatt ggaagctgtg ctgctacact gtttaaagaa taccagtcaa agattgtttt	8760
aatggatgca ggaccctggt gtatcatggt gtctactata agtagacaca gatttaggaa	8820
ggccagcaag taaaagttac tttcatctta tacaagcata gctggtagt gattatatgt	8880
tagtattccc acaacttttc ttataaattc tatgttgtga gttggggaaa ctgcattgtc	8940
ataactagtc tttttttttt tcccccccag tattttaccg ggattgtcaa gtgcagatac	9000
atatctaaaa ttgaaagttc cacatgttct taaaattaca tttagttatt tattgcttat	9060
gtaggtgtat gggcaagcat cattttgttc ctctttaggg gattataagg actagaattc	9120
cagtaaaactt agctctccaa taatgcgtaa caagctaacc cttttatgtc cctaattccag	9180
ggtttaggag gtggaggcag aagggtctca agagttaagg gcagtctctg ctaaactctt	9240
gagttccagg ctctcctggg ttacagagtg aaatagcaca cagtggtaga ccatttttag	9300
cacaaggccc cagattttgc taccacaaaa gaatacacat gctaaagtat gtttttccta	9360
aattttaatt gtgttttagg gcagattaaa ggcataaaaa attagtttga ttaaaaaag	9420
atagatggga taattaaagt gaccttagtt tgtggatgat attctatatg tagaccctaa	9480
aagcctcacc agagaactcc ccctttttat gtaccaccta acaaacatgg gcaggaggga	9540
aatctggaaa aagtcttcat agtcatctca gacaacagag gctggagagg cgagccagtg	9600
gttatgtgtg catgctgctg cttgcacctt tcagaggtca gtttcagca tctgtatcca	9660
gaggctctac agctgcagtt atccccaggc ccagttgagt cacgtgctgc tggccttcag	9720
gcctccactt catggcacct gcactcacc acatcctcta cccagacat gcagataatt	9780
aaaagtgtta aaatgggggc cgttgagagc agcacttggt cttgcacaga ggatcagagt	9840
ttggttccta ccactcacat ggtggctcat aaccatccat tactccactt ctctccaact	9900
cccctttctg tcatccttgg gcaccaagca agcatgtggt acatatatat taccttcagg	9960
caaagcactc atttatataa aattacttct taatataaaa aaccaagggt taggtatggt	10020
agtgcaggtc tttaatctca gtcctttgga gttagaggca ggtggaccat ctagggttac	10080
ataataagac cctaccttta attcagtttt atccatatga actatgtata acatgaagta	10140
tgtgtaatgc tctgcattat catatgtgtg tgagttttgc atgttcatgt tcaagttcag	10200
taagaattag ttcatagctt ccctagttga aattctttta tttggtagt cggtttgga	10260
tacatactat caaaattatt tcctgaaatg tgatgaaata ttgtataatt ctccatgagt	10320

ES 2 845 644 T3

gatgacctat	ggattacttt	aagtggacag	ataagtgcac	tttttatggt	atacattata	10380
ttgtatttat	aggatggcta	tatcgtaaac	atccattact	ttacataggt	atttctactc	10440
ttacatcaag	acattgtaga	tacacaatgt	tagtaattgt	aatctctagt	ctaaatattg	10500
ttctccctca	gagattatgt	gtcggctcac	tagcttcttc	ccaatcttac	tctaccatat	10560
tagctgagaa	ttaattgtta	ataactggga	gctgtcacag	gaccactggt	ttacatttac	10620
tattctgtcc	ttgagtcagt	tttatgaccg	ccacgtctat	ttacagatca	tctttgactt	10680
ctttttctat	atgagaccat	atggcaaatg	tatagcccat	aaagcctaaa	atattccctg	10740
ttgtgaccct	gtacagaaaa	tatgttctgt	taaaattaaa	taaccttcaa	gaggtagctg	10800
tcaagaaatt	gagtggagtt	taatgaataa	gtaggaggag	ggttcttagt	ggaattttgt	10860
ttcacattgc	atgtgtgtgg	tgtgtatgca	gtgtgcagtg	tagatctctt	gttttgaggc	10920
agtctgatgt	aggccaggct	ctcgccatct	cttgggacag	gggatcctgc	tagactgttc	10980
agctggagtc	ccttgtttct	gcctcctgca	ttcagagtta	gagcactggg	cctcaaaactg	11040
acagtgtaaa	tacttcccac	tgtcttagtt	tctctacccc	ttcacatttt	tatgtgctgt	11100
tgggattaaa	ctctgtgcct	cccatgccac	cagccttcta	gtgtttatag	aatgaaaatg	11160
taggttataa	ccaaacaaac	tcaactgttt	tcctaggttc	tacaactcta	agattaggtg	11220
aattttgcct	ctacctccga	gtgctgggat	taaaggtgta	tgccaccaac	actacgcagg	11280
ctattatctt	ttaacaaaaa	aattttaaact	tttgatctca	gcagaatacc	caacatagtt	11340
ggtttcttaa	aagccttttag	gatgtttaga	cttgagatgg	gtgacctatc	tttttgattt	11400
ggaataatta	acccatgccc	tataaaaaaa	ctccaagcta	tttgagttac	agcagaattt	11460
ttagattcag	tctatataag	gcaaaatttt	cattaaaaagt	ttttagaatt	tttagaattt	11520
atagaatatt	tccagctggt	tcttaatggg	attccaggca	tgtgccactc	agtccagctt	11580
catgagtgtc	ttctgaatgc	actgtaatgg	agagcaaaat	taaagacagg	accatccata	11640
tgtatataca	cataacttca	gtttttgctt	aatacaacca	gaaagattac	accctggtga	11700
ctaacttgct	ttgttcatgt	gtgtcatggg	ctattttttag	gtcagtacat	gagagccctc	11760
tcattctctc	agtggctgaa	tattccactg	tatggttgta	ccttgcacaa	ctagtttccg	11820
tattgatgga	catacatatg	gttgtgttta	gtttttgcta	acattataat	gggttagata	11880
aagcctataa	tgtaaggaaa	cagatagtgt	aagctacttg	aaagaaaaaa	gaaacttcct	11940
tgccacagtc	actcactaaa	tgaaattgaa	taagaacact	atcaggagtt	gtgaggatga	12000
ggggctgaag	agatggctca	gcacttaaga	gcactggctg	ctcttccaaa	gggcctgggt	12060
tcagttccca	gcaccacat	ggcatgtgga	tctgacaccc	tcacacagac	atacatgcag	12120
gcaaaatata	aatgcacata	taaatgagta	aattaataaa	tgtatatatt	taaaaagttg	12180
ggaggaccaa	aattgatact	ttttctctga	tctttttgcc	atgtgtatat	ctgaattctt	12240

ES 2 845 644 T3

tgtttttaaa gaagaaacag cattgaagca ttatttgggg ggaaaaacac acacacaaaa	12300
tccagcaact caacattcat gagcagctct gttctatacc agtatgtgcc tgtgcagtgg	12360
aaggaaagca attttggtaa ggaattaaaa cttcagcttt aaactcccag caggttgata	12420
tttatcaatg atgaatcaaa cagaaagttt taaataattc attgacagcc ttttttttag	12480
ttgtaaagtc accatacctt taatatctgt aatttcagtg taaagttttc cccccttttt	12540
ccttaaagaa aaactatgaa tttgcagcca acaaagtta gatgtatcta aggtatgtat	12600
ttcttctgac attaagtagt ccattacgat gtgttatctt gcacttcaag ggaccaagtt	12660
tactaattgc tgagttttca taaagtaaca agctttttct agggggccatc catttagatg	12720
ctttaaaatg ttcatgtatt ttggttatta cagaatattt attgttagta cctgtttgac	12780
taaacataag caggatatct gttatgcttc tttcattaat taaacttttc tgccttttgc	12840
attacatagg aaatatatcc cggacagttc cagccgtctc tgtgtcacia attcatagct	12900
ttgtcagata aggaaggaaa actacttcga aattatactc aaaatataga taccttgagg	12960
caggttgcag gaatccaaag gatccttcag tgtcatggtt agtgacgtca cagtggctct	13020
cgtagggcgt tcaataggtt accgggcttg gaaagaagct gctgtctagt gacgagacta	13080
agcgttattt agtaaccttg agtggacaaa attgaaaagg acacaaacaa agctgaaggc	13140
ctcagatgtg gtgggtatac tttgataaca agttcaaggc tagccttgac taaacaagac	13200
acagccaagc taaggtaact cagttggaac cttccagctg cagttttggc acttgacagag	13260
ttatgttatt gcaaatagta gctttagaag ataaggctta tatacacatg tattagtaga	13320
taaactatat cacatgtatt atattcctta aatacgtcac aggagagttc aggttagtct	13380
tcatggtggg gctagagaga tggctctgca ttttaagagca ttaagagcac tgactgctct	13440
tccagaggtc ctgtgttcaa tccccagcaa ccacatggtg gctcacaact atctgtaatg	13500
aatgccctct tctggcatgt agcagtgcag gcagatacag cattcataca taaaactgta	13560
aaaagtcttc atggagcaag ccacaaatag cccttcaata aatgttctat ttggtgctgg	13620
agagatggct cagtggttaa gagcaccaac tgctcttcca aaggtcctga gttcaaatcc	13680
cagcaaccac atgggtggctc acaaccatct gtaatgagat ctgacgctcc tctggtacat	13740
ctgaaatctg aagacagcta cagtgtactt agatataata ataaataaat attaaaaaaa	13800
aaaataaatg ttctattttg gttgttttag gttcctttgc aacagcatct tgcctgattt	13860
gtaaatacaa agttgattgt gaagctgttc gtggagacat ttttaatcag gtaatttaat	13920
tcatctcatt ttaggaattg tgtaaaacttc acttttggtt gtatcttcat ccccccccc	13980
cccccttct gagaagcatg agtggttagaa atcctgatgt aaacaggtct tttttgcaag	14040
agcatgttag agcacacttg aaggctgagg cagggcactg taagagtcag gctaacctga	14100

ES 2 845 644 T3

gctggatagc	aagagtctca	ttttttaaaa	aaaaagtttt	tctgttgctc	agttggtaga	14160
tcatggctgc	ttagcatttg	tagtcctggg	attgctctcc	tgcctgaaat	cctaccattt	14220
aaggagggtg	gagaataaga	agttgaagg	catggtcacc	tacaaactct	ttctcaaacc	14280
aaccaaccta	aagtcctcct	taatacacct	aagcacctcc	ttatataatc	taggcctaag	14340
tcacaagttg	caggaacac	ctctggaatt	agtcttacat	tagttgtggt	aagattttaa	14400
acacttttca	aatgataat	gaagtattta	ttacaggaaa	atatagcaac	acacatccag	14460
atatatgttt	taactttgaa	ctcatgtata	accaggaaaa	aaaaagacag	tatactcaaa	14520
tggagtcatt	ttcataaata	tttttaaaag	gtottgtttt	cattctttac	cacgctcttt	14580
gcataattat	agtatcttgt	gggtgcacag	tgcgtagggg	gaaatgatag	catgtgtgga	14640
gactggataa	gagagatcag	gctgtggagg	tcagaagatc	aacctgggag	tcagtttcca	14700
atttctacct	gggagttaa	tttggtgtgc	cggtctgggtg	aaaagtgtcc	ctgcctggta	14760
ggtcacccac	ccccaggctc	cacactggct	ccacagcaga	cactatcaaa	ttcacagcgc	14820
tttgtttgct	gggaatgtgc	cgagtgtctaa	cctgggctac	ttgactttca	tgttttgtgc	14880
aggtagttcc	tcggtgccct	agggtcccag	ctgatgagcc	acttgccatc	atgaagccag	14940
agattgtcct	ttttggtgaa	aacttaccag	aacagtttca	tagagccatg	aagtatgaca	15000
aagatgaagt	tgacctcctc	attgttattg	gatcttctct	gaaagtgaga	ccagtagcac	15060
taattccaag	taagttgatg	tttaggggac	agttgtgcat	gctgtgagtt	gtggatctgt	15120
gtaagatgtg	attttactct	tttcatttag	aaaatagttg	aaggctctaa	ttttactttt	15180
taggtgatac	tcataaagtg	acattttggt	atgggaatgg	gactgtgaag	acagaatatc	15240
agattttaat	tgtagtccat	ataaaatcaa	agcaaaactg	tttgacgcat	gcttttttagt	15300
agtgtgcata	ttaaagttgc	agaggtcagc	tttaattaat	tccaggaata	gtctcttctt	15360
tttattttat	gtgtgggggt	gtttgcctgc	atgtctgcct	actttggcca	gacaagaatg	15420
ttaagagtgt	ccttccaagg	ggctggtgag	atggcttagc	agttaagagc	actgattgct	15480
cttccaaaat	aacacttta	aaaaaaaaag	tgctgcccc	tccccaaac	agtagttctc	15540
aaccttccta	atgatgtagt	cccttttgta	caattcatgt	tataacctcc	aatgataaaa	15600
aatttgttac	ttaacctata	atttttgcta	gttataaatc	acaatgtaaa	tatctatttt	15660
ctgatggctc	taggcaagcc	ctgtgaaagg	gtcattcact	cccaaaggag	ttgtaaccac	15720
aggctggtg	acctactgct	ctagaatatg	tacagtatta	gtatccctc	attgctattt	15780
tatgtgctta	tgtatgaaag	aagtgtgtgt	gtgtggtgtg	tgttccagag	atggactgat	15840
cagtagtgaa	gaacgtatt	cttgagtgga	cccaggactc	acacccaaat	tttgtcagtt	15900
tataggggat	ctgggtcctt	gtttggccaa	gtacttacat	tgtacactta	catggatgta	15960
ggcacataac	ccgtccccct	ctcccccaac	acactccatt	tcttgaaaca	gatctcacta	16020

ES 2 845 644 T3

tacttggcac ctgggatacc tatgtagact aggctagccc cacattccag tctcctgagt	16080
gatggatggg atcaaagctg ttcccagcta atctttggta gccaggagtg gtagtatttg	16140
gtagcagggg tgcctgtaaa ccatgtggta tagggcagga agagtcagga gttctactca	16200
gcagatttga agccagccta ggatagatga aaaaaatgag ttctattcca taatagtgtg	16260
agttccacaa gaatatttac ttatgtctag gagttcagcc tatgggcca cataatccca	16320
aagggtaaat tttttgaatt gaaaccactc ctccatgtcc aagtttctgt cattcttgat	16380
gtcctcaaag atccaccgc ctctccctcc caagtgttaa agccatgagc cttcacaacc	16440
agctagaact tttttttttt aagctaattt aaaggattag tttaagcttt ctgaactgga	16500
acacctagga tctcagctaa gtcttgaaca gaagtgccat gagtttaagg cctgagcggg	16560
aggaaagtct actgtttgtt attgagagga agttgctttt gaaaatgtga tttgtatttc	16620
tgcttgcccc tctttttgtt gttgggatta gcgggggtgt gctaccatgc ccacctcttg	16680
acagtgttta aaattaactt ctcttttcta actccccttt tcaccccat tttaggttct	16740
ataccccatg aagtgcctca aatattaata aatagggaac ctttgcctca tctacatttt	16800
gatgtagagc tccttgagga ctgcgatgtt ataattaatg agttgtgtca taggctaggt	16860
ggtgaatatg ccaaactttg ttgtaaccct gtaaagcttt cagaaattac tgaaaaacct	16920
ccacgcccac aaaaggaatt ggttcattta tcagagttgc caccaacacc tcttcatatt	16980
tcggaagact caagttcacc tgaaagaact gtaccacaag actcttctgt gattgtctaca	17040
ctttagtagc aagcaacaaa caacaatgtt aatgatttag aagtatctga atcaagttgt	17100
gtggaagaaa aaccacaaga agtacagact agtaggaatg ttgagaacat taatgtggaa	17160
aatccagatt ttaaggctgt tggttccagt actgcagaca aaaatgaaag aacttcagtt	17220
gcagaaaacag tgagaaaatg ctggcctaata agacttgcaa aggagcagat tagtaagcgg	17280
cttgagggta tggaatgcgt tttgttgaat cactttcaaa gtactgtgat cagaggaggg	17340
tgattcccaa tgtcagataa ctgttttgac attagttgat gaaggtagtg ctatgtgttt	17400
gtgtgtatta agttaagta agtttgggcg atgagtttgt ctttgctggc agtagtgtgt	17460
atgattaaac ctggggcttc aagcagctag ggaacgagat ctgtcagctg agttatatcc	17520
caaaagtggg ttttactccg ttctcccacc tcccagcaa atgattaaga cttgggtcag	17580
tttatgatct tatagggtgg gaaccatgtt ctgggtggga aaactcaggg ttgaagatgt	17640
acccagaag gtaattagtc ctaggtctgc cttaaggctg taccctcttc taccttcttg	17700
ctcaacaag gctgccttgt ttaagatctc gaaaacaggg ttcctatcta ctggacacct	17760
atthtgcct gtcaactgtt aggggtgtgc aaacactgct ccctcccctc taacacaggc	17820
acaatctgtt catacacaat gggaggcttg tgctctggga attgcacttg gcctgtatca	17880

ES 2 845 644 T3

tatttgcccc	tggaacaagc	tttggaaagta	tgtttctggt	cattgggtgca	aacaagggag	17940
ctgttagact	tgaaaagatg	taatcccagc	cttcaggagg	cagaagtaag	agttgagttc	18000
aagagtaagc	caacaagtta	ggtactaagg	gacacataaa	attctaagtg	ctatttttctt	18060
ctgtatttca	ggtaatcaat	acctgtttgt	accaccaaat	cgttacatat	tccacggtgc	18120
tgaggtatac	tcagactctg	aagatgacgt	cttgtcctct	agttcctgtg	gcagtaacag	18180
tgacagtggc	acatgccaga	gtccaagttt	agaagaaccc	ttggaagatg	aaagtgaaat	18240
tgaagaattc	tacaatggct	tggaagatga	tacggagagg	cccgaatgtg	ctggaggatc	18300
tggtatttga	gctgatggag	gggatcaaga	ggttgттаат	gaagctatag	ctacaagaca	18360
ggaattgaca	gatgtaaact	atccatcaga	caaatacata	cactattgaa	gctgtccgga	18420
ttcaggaatt	gctccaccag	cattgggaac	tttagcatgt	caaaaaatga	atgtttactt	18480
gtgaacttga	acaaggaaat	ctgaaagatg	tattatttat	agactggaaa	atagattgtc	18540
ttcttgata	atttctaaag	ttccatcatt	tctgtttgta	cttgtacatt	caacactgtt	18600
ggttgacttc	atcttccttt	caaggttcat	ttgtatgata	cattcgtatg	tatgtataat	18660
tttgtttttt	gcctaagag	tttcaacctt	ttaaagtttt	caaaagccat	tggaatgtta	18720
atgtaaaggg	aacagcttat	ctagaccaa	gaatggtatt	tcacactttt	ttgtttgtaa	18780
cattgaatag	tttaaagccc	tcaatttctg	ttctgctgaa	cttttatttt	taggacagtt	18840
aactttttta	acactggcat	tttccaaaac	ttgtggcagc	taacttttta	aaatcacaga	18900
tgacttgtaa	tgtgaggagt	cagcaccgtg	tctggagcac	tcaaaacttg	gtgctcagtg	18960
tgtgaagcgt	acttactgca	togtttttgt	acttgctgca	gacgtggtaa	tgtccaaaca	19020
ggcccttgag	actaatctga	taaatgattt	ggaaatgtgt	ttcagttgtt	ctagaaacaa	19080
tagtgccctg	ctatataggt	ccccttagtt	tgaatatattg	ccattgttta	attaaatacc	19140
tatcactgtg	gtagagcctg	catagatcct	caccacaaat	actgccaaaga	tgtgaatatg	19200
caaagccctt	ctgaatctaa	taatggtact	tctactgggg	agagtgtaat	attttgact	19260
gctgtttttc	cattaatgag	gaaagcaata	ggcctcttaa	ttaaagtccc	aaagtcataa	19320
gataaattgt	agctcaacca	gaaagtacac	tggtgcctgt	tgaggatttg	gtgtaatgta	19380
tcccaagggtg	ttagccttgt	attatggaga	tgaatacaga	tccaatagtc	aaatgaaact	19440
agttcttagt	tattttaaag	cttagcttgc	cttaaaaacta	gggatcaatt	ttctcaactg	19500
cagaaaacttt	tagcctttca	aacagttcac	acctcagaaa	gtcagtattt	attttacaga	19560
cttcttttga	acattgcccc	caaattttaa	tattcatgtg	ggtttagtat	ttattacaaa	19620
aaaatgattt	gaaatatagc	tgttctttat	gcataaaaata	cccagttagg	accattactg	19680
ccagaggaga	aaagtattaa	gtagctcatt	tccctaccta	aaagataact	gaatttattt	19740
ggctacacta	aagaatgcag	tatatttagt	tttccatttg	catgatgtgt	ttgtgctata	19800
gacaatattt	taaattgaaa	aatttgtttt	aaattatttt	tacagtgaag	actgttttca	19860
gctcttttta	tattgtacat	agacttttat	gtaatctggc	atatgttttg	tagaccgttt	19920
aatgactgga	ttatcttcct	ccaacttttg	aaatacaaaa	acagtgtttt	atacttgtat	19980
cttgttttta	agtcttatat	taaaattgtc	atttgacttt	tttcccgtt		20029

<210> 5

<211> 1028

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

cttttcactt gtgaatacca attaggtttc cagtttctca taaagatcta acaaataccc      60
aatttctcca tcagactgac atcccttaac aaaagcagag tttcaattcc ctgcatctcc      120
tttaggagct atgatataat gtaggtagaa atcttgccct aactccattt acccactgtg      180
ctataaataa gcagaagcaa atatTTTTTT aaggctggag aggtttttaa aatctgaact      240
aatttagcaa ctgctgctgc actcagtttt tggcagttcc caaacatcca ttatcatgta      300
aggataaatc cttctaaacc agaaaaatgt ttcctacttg gaaaaggcat aagaaaatac      360
atatacgacc tccccatgta ctagtcttac ataccccgag tccagttaga actataattt      420
ttttgcactc ttgcagtaat ttcacagcat cttcaattgt attaatatct tttctTTTTT      480
tccttttttg tggttctgaa aggatattaa taacaatctg ccacagtgtc atatcatcca      540
actcaggtgg aggtattgtt tccggcaata aatctttaag aattgttcga ggatctgtgc      600
caatcataag atgttgctga acaaaagtat atggacctac aataaggggg aaaaggctta      660
aagtcaactt atcaagtaat tcaaaatctc atttattttc tgaagtaatg agttagcatt      720
ctgtgagggg tttttgcaaa gtaagaaaat gcaatttaat ggtatttcat tctcggtaga      780
ctcagaatta atgctatatc ccaatgagat taggaagatc taatgaagag ttgggaagac      840
ccccttcagc tgtaagtata tatttcaaga gtctaattaa ttaacaacca gaattaagtt      900
cttatgggta atatctagaa acacacacca taataccaaa agtatttaca aaagggttct      960
acgacataga aaaatcgtac cagtcctaaa agcctgtact acttatcatt aaaaccacac     1020
aggaaaaa                                     1028

```

5

<210> 6

<211> 429

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

10

<221> variante

<222> (7) .. (7)

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

<220>

<221> variante

15

<222> (373) .. (373)

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

<220>

<221> variante

<222> (400) .. (400)

ES 2 845 644 T3

	<223> puede ser a, c, g o t	
	<400> 6	
	cgacganaac ataagcactt ttaatttcct ctctattatg ctacagacaa ggccgaagac	60
	tgggtttttt aggttggtta aggctgtaaa gaaaacaaag aacatatgac agagacccta	120
	tgcagtctgc aaagcatact acatatttac taccaggccc taccttacta cagaaagttt	180
	gctgatccag ctgtgaacat ataccccgat gcagatgaaa acaaatacaa aacaaaccta	240
	acttgccatt ttggtcacia gagcaagtaa gtagcagagc cctgttttga tatgaaaatc	300
	cagcactgga ctgggcaaca tggcgagacc ccatctctac caaaaatact aaaaaaatag	360
	ccgggcatgg tgnngcacat ctgtagtact agctacttgn gaggctgaga caggagaatc	420
	atttgagcc	429
	<210> 7	
5	<211> 156	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
	cctgtatata cacacactat gcaatagtct taggtaacta attagctgca accctaaggt	60
	agatcaaata gaaaatgtca agtcgccaca atcacatcat cttaattaat atggagggaa	120
	ggtaggaatc tgttactctt cccaacacta agcttt	156
10	<210> 8	
	<211> 593	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<220>	
15	<221> variante	
	<222> (460) .. (460)	
	<223> puede ser a, c, g o t	
	<220>	
	<221> variante	
20	<222> (571) .. (571)	
	<223> puede ser a, c, g o t	
	<400> 8	
	tctcactgtc tcccaggctg gaggcgaatg gtgcaatctt ggctcgctgc aacctccaac	60
	tcccagggtc aagtgattct cgtgcctcag cctcctgagt agctgggatt acagggcct	120

ES 2 845 644 T3

gccaccatgc ccggctaatt ttagtatttc tagtagagtt gggatttcac catgttggcc 180
aagctgttct cgaactcttg gcttcattgg atctgccgc ctcggcttcc caaagtgcta 240
ggattacagg cgtgagccac tgcactcagc cagaaaagat tattttaaata aattgaatgc 300
atgcaactgc agcatctttt gaaatcaaaa gcaaattaat atctgaggtt ttctataatt 360
aactgtcaag gccaataactt ctgggttttat tatttttggg ttctactttt ctgaggttat 420
cgataaatgg agaacaatga ttaaataaat gctttatctn cacttctcga tggcagtcag 480
ctttaatgga aaatatatttc ctataaacct aaattaattt ccggaaaccc cttttgaggt 540
taactaccat tgcactggaa taatctttgg natcccggaa ccctgttcaa ggg 593

<210> 9

<211> 373

<212> ADN

5

<213> Homo sapiens

<400> 9

ggcacttcat ggggtatgga acctaaaata gggtgaaaaa taagagttag aaaaaggag 60
gaggaagtaa gctaataaaa ccacaacaga tacattatgc aaaaatccaa caagggttg 120
agctccaaat tccccaaaaa gacccatgca ctaaataactt aaccaagcca ttacatttca 180
tcaagcaagc agatgggcag ttaagtgtct tttataaaac gctcaagttc tgctcctatc 240
acctggttac ccctgagcaa tcttcccaga ctttcccact ctgaacctca aatttccttg 300
tctgcagaat ggggatgata atagtacttc tccacaagac tgtggtgagg attaaatgag 360
ttagtcaagt gca 373

<210> 10

<211> 1713

10

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 10

gggctcccct cagcggcctc tggcgccctc cgcccgcccg acccggtcgc tcgctcgtc 60
gctcgtcgc ttgctcgtcc gggatcgccg cgggtggttca agtttgcat ggcgcgccca 120
cttcccacct gggcctcacg cgtgcacctt gcctgcctgc gcctcttcgc ctcaagtcgg 180
cttttacctc aggggctctg gagagcccaa cctggccgac gccggccttc ctgaggagaa 240
ctcctccacc tgccttgccc ttgctctgtg acagctcttc ctgaggttac ccctgtggtc 300
tctcctcagg aagtttgccg tctctcccaa tctcccttct caagtgcaat ggaatgccca 360
agccagccct cggggcctgt tgccctcctg gaaagatctg gcgattgagg acccgcccta 420
tctgctctct ggaccaccca ggtcctctgt acctcgcttt agtctttggg aaaattcatc 480
tcttggggca gcaagagaga ggacagaagg gagagtgggt ggttctccac aaacttctgt 540
gttaagagtc agattgggcc tgggctcttg tgacttgggc gattgactga accttttcta 600

ES 2 845 644 T3

agcccagttt ttaatcatct ctaaaatgac agggccagga ccgaaagaga ctgtagctca 660
gttgtaaagt cacgcttgcc agacaacccc gaagccctag agagagggag gaaggagggt 720
aagttgaagg taatctccaa ctacttagga agttcaaaaa aggcctggaa tacataagac 780
ctcgtctcaa aaacgaaatt taaaacgata gaccatgaga aatcagctag tcagggttaa 840
agtaaagac attagtttta aaatcctagg cagttgatgg tggcacaggc ctttaatccc 900
agcaagctgg aggagacagg aggaggttca ctaggacagc caaggctaca caaagaaacc 960
ctgtctcgaa aaaataatct tacttctaga attgtagaaa tggctctgta gttacagca 1020
cttggtgctc ctgcagaggc cctaggtttg actcccatca tccacatgac agctcatacc 1080
ttcagatctg acacctgctt ttggtaaaca cagacatgta tggagccaaa agacccaaac 1140
acataaaaat cctctttggt gttgttttat gagttagggt ttctctgtgt agccctggct 1200
gtccaggaac tctgtagatc aggctgtcct tgaactcaga ggccacctgc ctctgcttct 1260
tgaactgctg ggattaaaga tgtacaccag caagcccagc ataaaaatac atatttaaatt 1320
aattttttta ataatcctta gttccttcac aactctaagc cccttcactt tctagttacc 1380
atgaaattct gagcacctgt atccatttgg atcattaggg ctcaattgca catggttcaa 1440
ttacagtggg gtttccccag atttttagagt tagaggcagc aggatcagaa aattaaatcc 1500
atttgacta ggtaataaat ttgatccac cctatctcaa aaacaaaaca ctagccacac 1560
gtggcagcac acacctttta caacaggact caggagcctg gcatgatggg acagaccttt 1620
actccctgca cttgaggcag atgcaggcaa atctaggcat cctggtgtac atatgaagtt 1680
caggcaagcc agggccacgt aggctcaaag acg 1713

<210> 11

<211> 14

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido

<400> 11

ttggtattca caag 14

10 <210> 12

<211> 14

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 12

aaactggaaa ccta 14

<210> 13

<211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 13
 gatctttatg agaa 14
 <210> 14
 <211> 14
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 14
 15 gatggagaaa ttgg 14
 <210> 15
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 15
 agtctgatgg agaa 14
 <210> 16
 25 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 30 <400> 16
 tgtaaggga tgtc 14
 <210> 17
 <211> 14
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 17
 aatctgcttt tggt 14
 <210> 18
 <211> 14
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 18
 10 aggaattga aatc 14
 <210> 19
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 19
 taaggcaaga tttc 14
 <210> 20
 20 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 25 <400> 20
 taaatggagt taag 14
 <210> 21
 <211> 14
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 21
 ttatttatag caca 14
 35 <210> 22
 <211> 14
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 22
 5 ttgcttctgc ttat 14
 <210> 23
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 23
 aaaaaaatat ttgc 14
 <210> 24
 15 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 20 <400> 24
 cagccttaaa aaaa 14
 <210> 25
 <211> 14
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 25
 ttttaaacc tctc 14
 30 <210> 26
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 26
 tagttcagat tttt 14

<210> 27
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 27
 agcagttgct aaat 14
 <210> 28
 10 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 15 <400> 28
 ctgagtgacg cagc 14
 <210> 29
 <211> 12
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 29
 gtctgatga ga 12
 25 <210> 30
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 30
 gtctgatga ga 12
 <210> 31
 <211> 12
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 31
 gtctgatgga ga 12
 <210> 32
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 10 <400> 32
 gmumctmgma tmgmamgma 20
 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 33
 mgmumcmumg mamumgmga mgma 24
 20 <210> 34
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 34
 actgacacct aattgtattc acatgaa 27
 <210> 35
 <211> 26
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 35
 35 tgagcagcag ttgctaaatt agttca 26
 <210> 36
 <211> 27

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 5 <400> 36
 tctacctaca ttatatcata gctccta 27
 <210> 37
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 37
 ttggtattca caagtgaaa 19
 15 <210> 38
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 38
 ttgctaaatt agttcagat 19
 <210> 39
 <211> 19
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 39
 30 gcagcagcag ttgctaaat 19
 <210> 40
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 40

	gcagttgcta aattagttc	19
	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 41	
	gccatgttgc ccagtccagt	20
10	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 42	
	gggctctgct acttacttgc	20
	<210> 43	
	<211> 20	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 43	
25	cccagtcttc agccttgtct	20
	<210> 44	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 44	
	gggtctctgt catatgttct t	21
	<210> 45	
35	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 45
 ttctacctt ccctccata 19
 5 <210> 46
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 46
 attcctacct tccctccat 19
 <210> 47
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 47
 20 ccttaggggtt gcagctaatt 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 48
 atcccagcta ctcaggaggc 20
 <210> 49
 30 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 35 <400> 49
 tctggctgag tgcagtggt 20
 <210> 50

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 50
 cctgggagtt ggaggttgca 20
 <210> 51
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 51
 15 cagatcccat gaagccaaga g 21
 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 52
 ctgactgcca tcgagaagtg g 21
 <210> 53
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 30 <400> 53
 gcccatctgc ttgcttgat 19
 <210> 54
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 54
 atcctcacca cagtctgt 19
 <210> 55
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 55
 10 gcttactcc tcctccctt 20
 <210> 56
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 56
 ccaggtgata ggagcagaac t 21
 <210> 57
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 25 <400> 57
 accctcctc ctccctct 20
 <210> 58
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 58
 ccactctccc ttctgtctc t 21
 35 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 59
 5 cctccttctt ccctctctt 20
 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 60
 gtctgtccca tcatgccagg 20
 <210> 61
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 20 <400> 61
 ttctgatcc tgctgcctt 20
 <210> 62
 <211> 15
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 62
 accctccttc ctccc 15
 30 <210> 63
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 63
 ctcttcttc cctc 14

<210> 64
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 64
 ctctctctc c 11
 <210> 65
 10 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 15 <400> 65
 ctctctcct ctctc 15
 <210> 66
 <211> 14
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 66
 atctgtctgc ctct 14
 25 <210> 67
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 67
 ctctctctc cctc 14
 <210> 68
 <211> 15
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido antisentido
 <400> 68
 accctccttc ctccc 15
 <210> 69
 5 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Exón 4 del CV396200 antisentido natural SIRT1
 10 <400> 69
 aactggagct ggggtgtctg ttca 25
 <210> 70
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebador directo
 <400> 70
 ccatcagacg acatccctta acaaa 25
 20 <210> 71
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Secuencia de cebador inversa
 <400> 71
 acattatc atagctccta aaggagatgc a 31
 <210> 72
 <211> 16
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de reportero
 <400> 72
 35 cagagtttca attccc 16
 <210> 73
 <211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Corresponde a CUR 962

<400> 73

gctagtctgt tg 12

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido que se une a un transcrito antisentido natural de Sirtuina 1 (SIRT1) humano para uso como compuesto terapéutico, en donde el transcrito antisentido natural de Sirtuina (SIRT1) es SEQ ID NO: 7, y en donde dicho oligonucleótido antisentido aumenta la expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) humana correspondiente a SEQ ID NO: 1.

2. Un oligonucleótido antisentido que se une a una transcrito antisentido natural de Sirtuina 1 (SIRT1) humana para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno metabólico asociado a Sirtuina 1 (SIRT1) seleccionado entre resistencia a la insulina, diabetes, diabetes de inicio en el adulto, nefropatía diabética, diabetes tipo 2, obesidad, intolerancia a la glucosa, colesterol alto en sangre, hiperglucemia, dislipidemia o hiperlipidemia, o para uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada a SIRT1, en la que el transcrito antisentido natural de Sirtuina (SIRT1) es SEQ ID NO: 7, y en donde dicho oligonucleótido antisentido aumenta la expresión de la Sirtuina 1 humana (SIRT1) correspondiente a la SEQ ID NO: 1.

3. Uso de un oligonucleótido antisentido que se une a un transcrito antisentido natural de Sirtuina 1 (SIRT1) humana para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno metabólico asociado con Sirtuina 1 (SIRT1) seleccionado de resistencia a la insulina, diabetes, diabetes de inicio en el adulto, nefropatía diabética, diabetes tipo 2, obesidad, intolerancia a la glucosa, colesterol alto en sangre, hiperglucemia, dislipidemia o hiperlipidemia, o para la prevención o tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa asociada a SIRT1, en donde el transcrito antisentido natural de Sirtuina (SIRT1) es SEQ ID NO: 7, y en donde dicho oligonucleótido antisentido aumenta la expresión de la Sirtuina 1 humana (SIRT1) correspondiente a SEQ ID NO: 1.

4. Un oligonucleótido antisentido para uso según la reivindicación 2 o uso de un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de Alzheimer, Huntington, Parkinson, Esclerosis Lateral Amiotrófica, Esclerosis Múltiple y trastornos causados por agregación de poliglutamina, demencia o neuropatía relacionada con SIDA (p. ej., neuropatía sensorial, neuropatía autonómica, neuropatía motora, retinopatía).

5. Un método para aumentar la expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) en células o tejidos de pacientes *in vitro* que comprende: poner en contacto dichas células o tejidos con un oligonucleótido antisentido que se une a un transcrito antisentido natural de Sirtuina humana (SIRT1), en donde el transcrito antisentido natural de Sirtuina 1 humana (SIRT1) es SEQ ID NO: 7; aumentando así la expresión de la Sirtuina 1 (SIRT1) humana correspondiente a SEQ ID NO: 1.

6. Un oligonucleótido antisentido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 o uso de un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, o un método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde:

- a. el oligonucleótido antisentido es un compuesto de ARNs; o
- b.. el oligonucleótido antisentido es monocatenario.

7. Un oligonucleótido antisentido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 6, o uso de un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 6, o un método de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el oligonucleótido antisentido comprende una de SEQ ID NOs: 52 o 54.

8. Un oligonucleótido antisentido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 o 7, o un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4, 6 o 7 o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la expresión de Sirtuina 1 (SIRT1) humana correspondiente a SEQ ID NO: 1 se aumenta en al menos 10%.

9. Un oligonucleótido antisentido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 6 a 8, o un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3, 4 o 6 a 8, o un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde el oligonucleótido antisentido comprende además una o más modificaciones que comprenden:

- a. al menos un enlace internucleosídico modificado seleccionado de entre: un fosforotioato, 2'-O-metoxietilo (MOE), 2'-fluoro, alquilfosfonato, fosforoditioato, alquilfosfonotioato, fosforamidato, carbamato, carbonato, triéster de fosfato, acetamidato, éster carboximetílico, y combinaciones de los mismos;
- b. al menos un nucleótido modificado seleccionado de entre: un ácido nucleico peptídico (ANP), un ácido nucleico bloqueado (ANB), un ácido arabino-nucleico (FANA), un análogo, un derivado, y combinaciones de los mismos; o
- c. al menos un resto de azúcar modificado seleccionado de entre: un resto de azúcar modificado con 2'-O-metoxietilo, un resto de azúcar modificado con 2'-metoxi, un resto de azúcar modificado con 2'-O-alkilo, un resto de azúcar bicíclico, y combinaciones de los mismos.

10. Un oligonucleótido antisentido que tiene las características de un oligonucleótido antisentido definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de entre 10 a 30 nucleótidos.

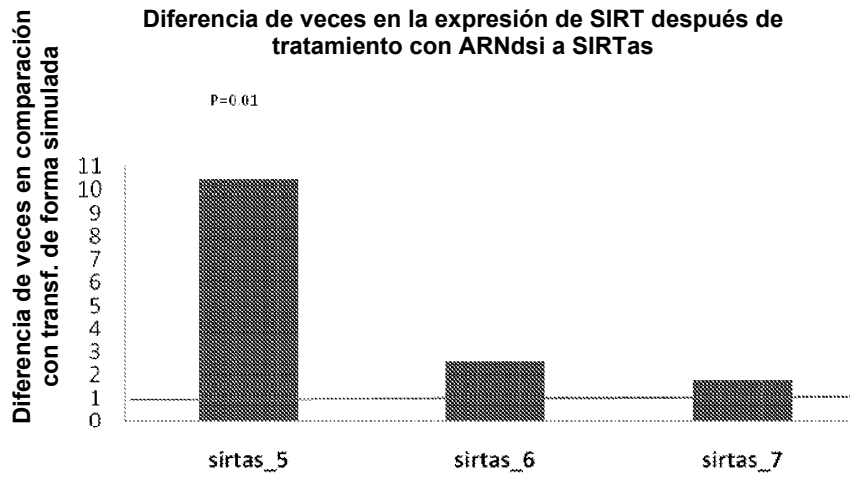
5 **12.** Un oligonucleótido antisentido según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el oligonucleótido antisentido tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con un complemento de un transcrito antisentido natural de Sirtuina 1 (SIRT1) como se establece en SEQ ID NO: 7.

13. Una composición farmacéutica que comprende al menos un oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10

FIGURA 1

A



B

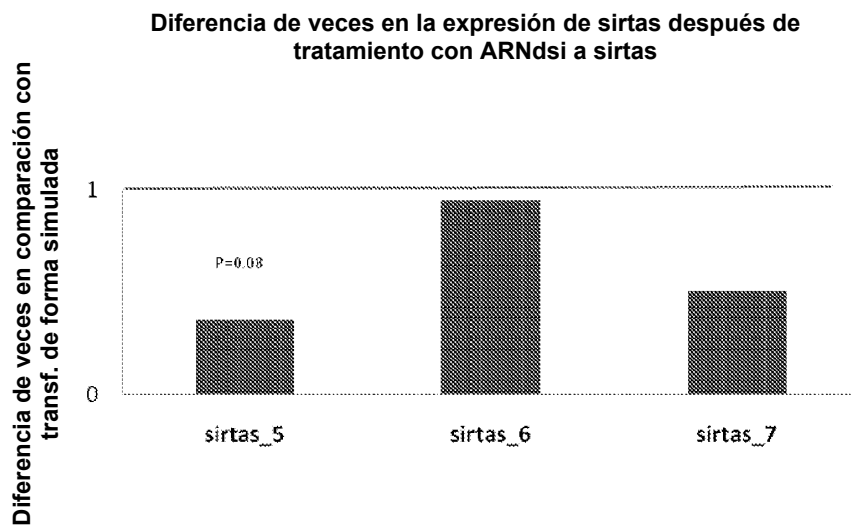


FIGURA 2

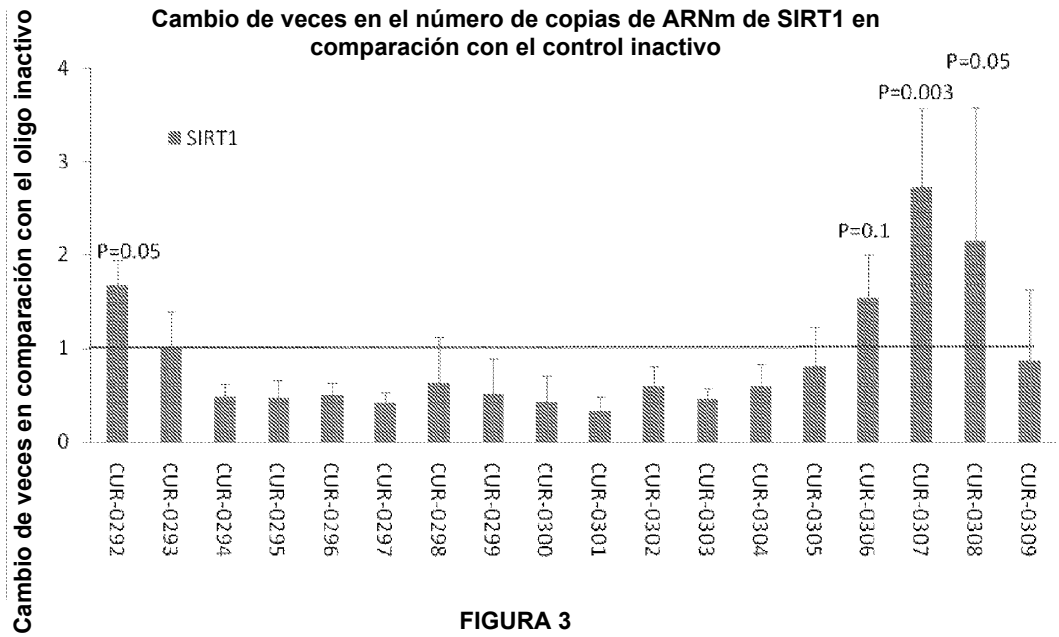
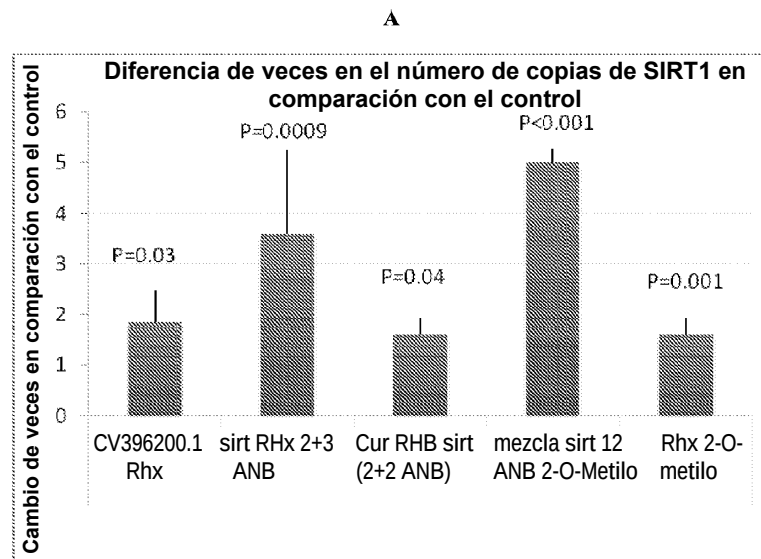


FIGURA 3



B

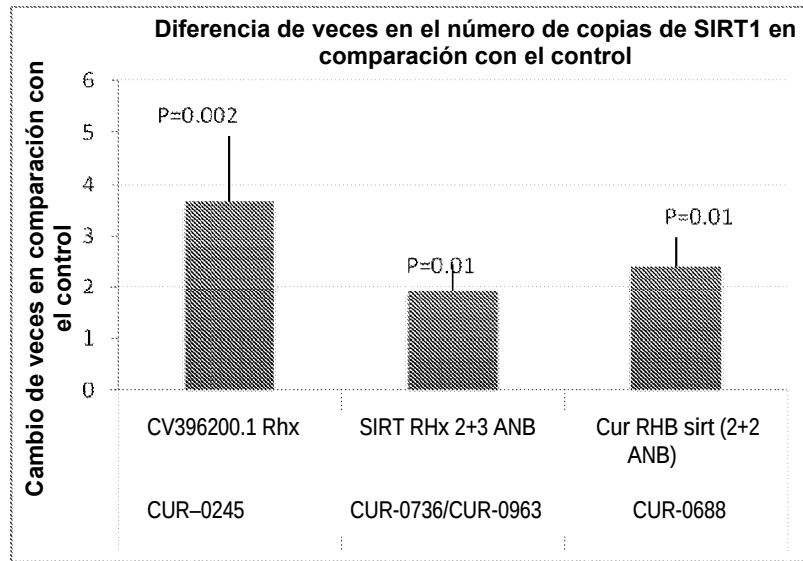


FIGURA 4

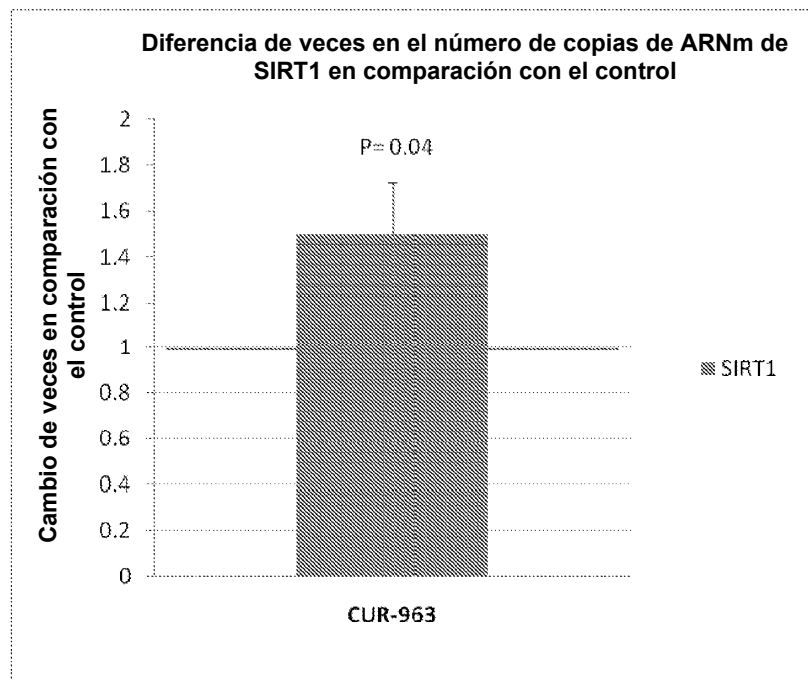


FIGURA 5

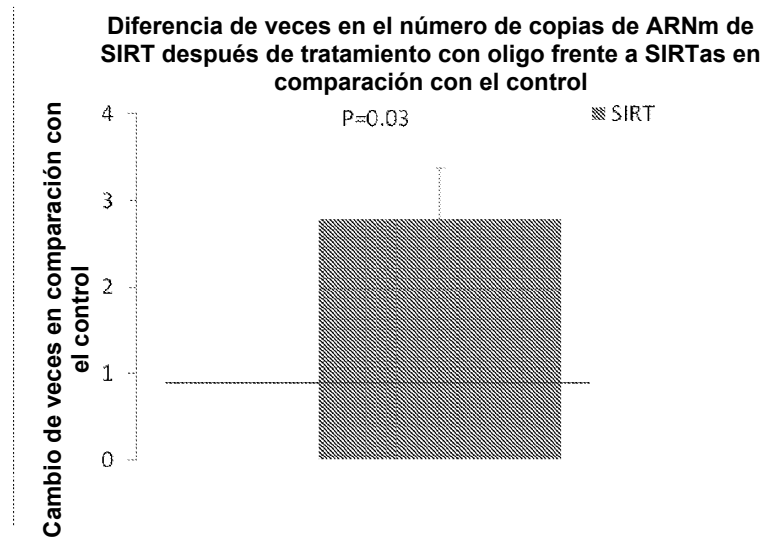


FIGURA 6

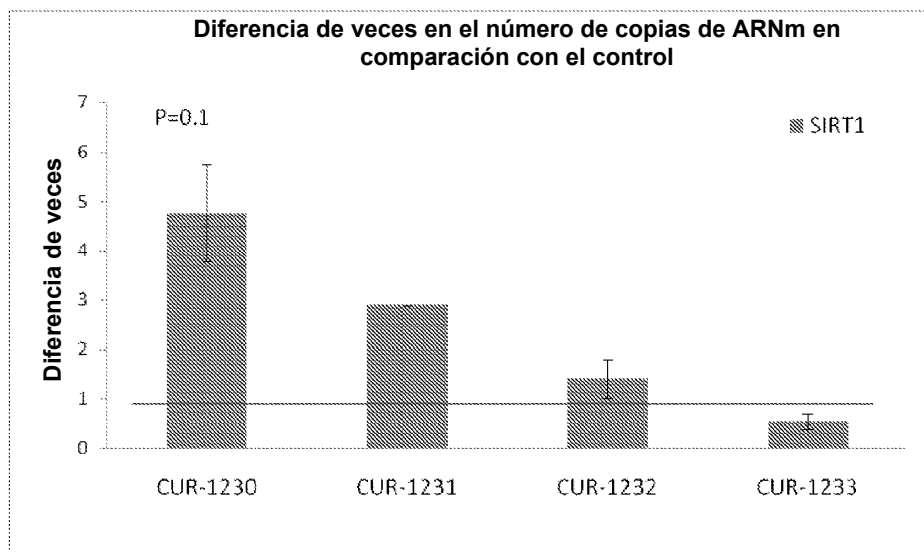


FIGURA 7

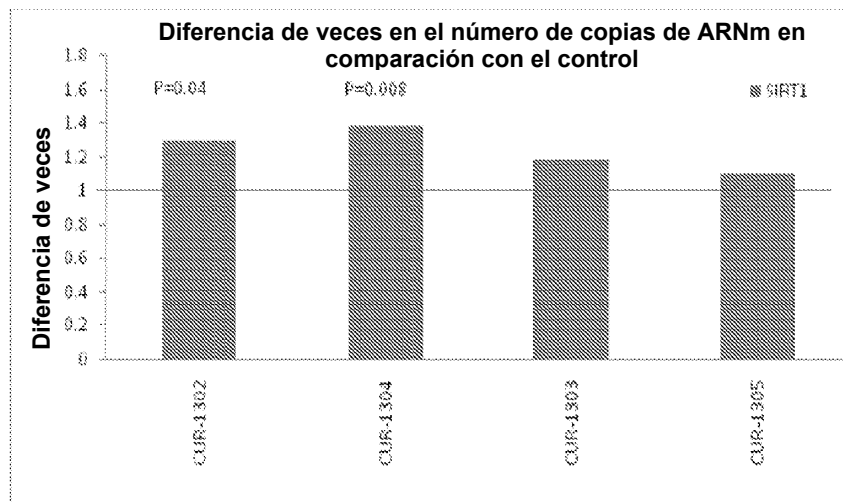


FIGURA 8

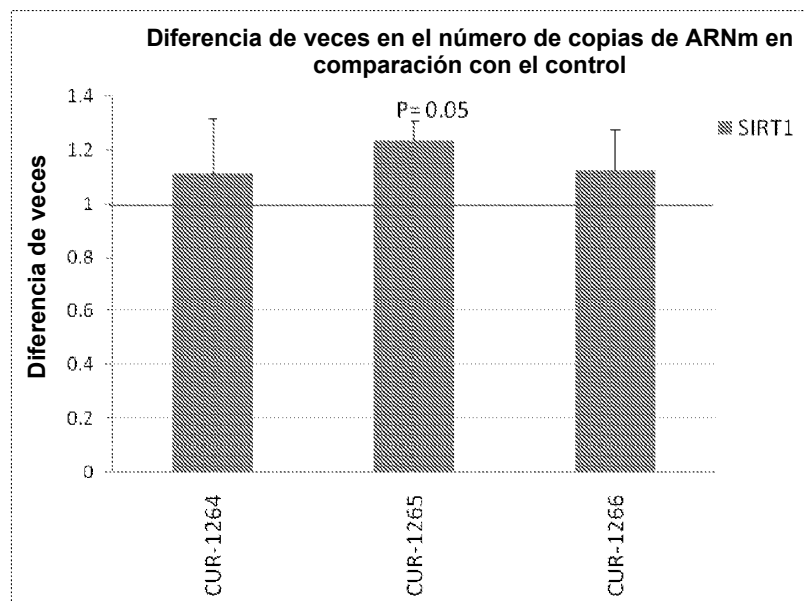


FIGURA 9

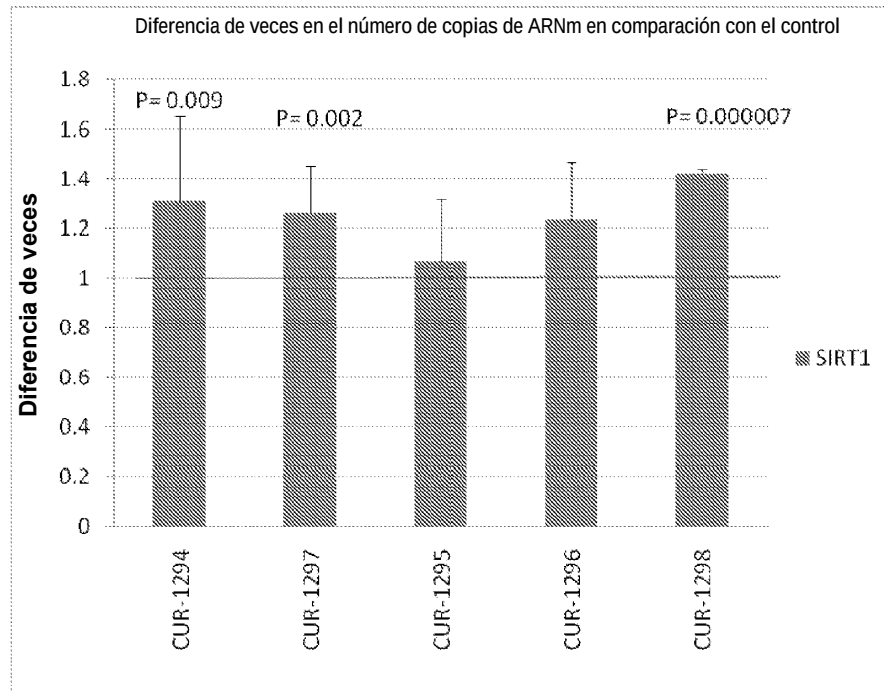


FIGURA 10

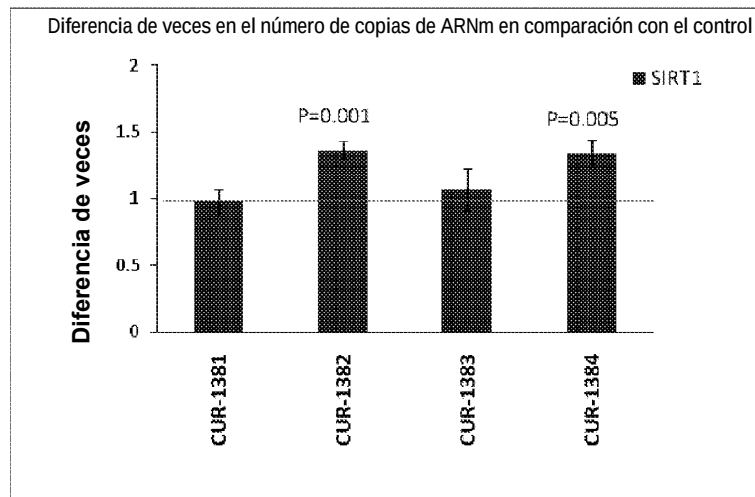


FIGURA 11

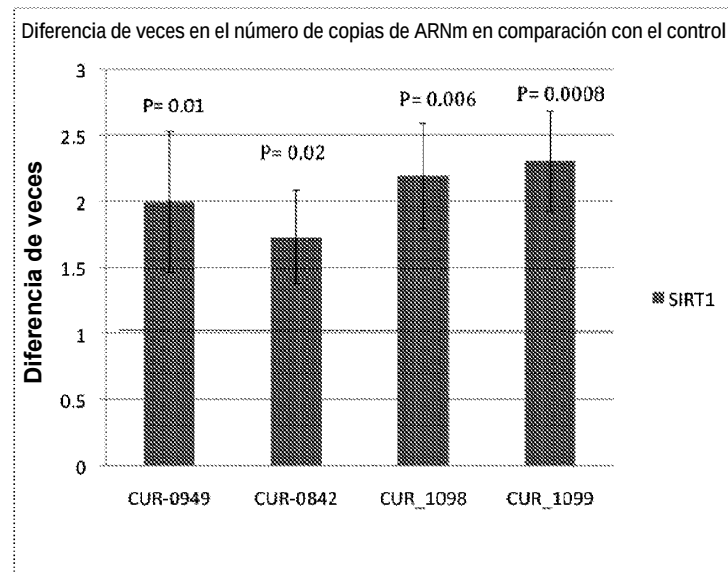


FIGURA 12

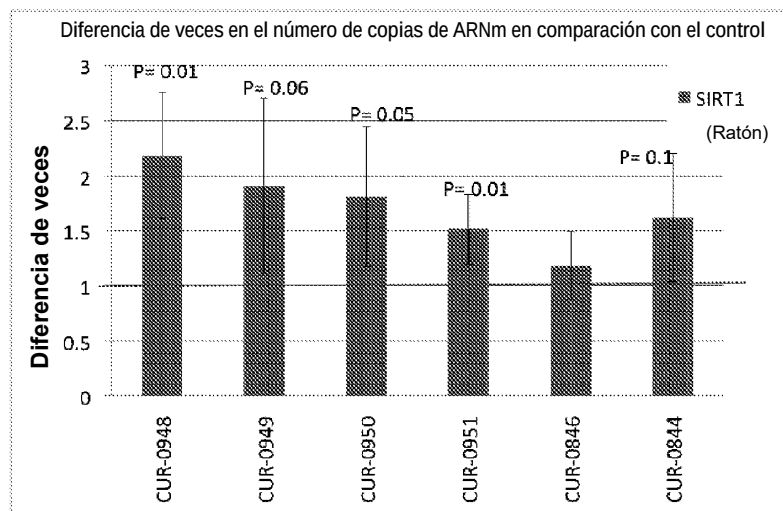


FIGURA 13

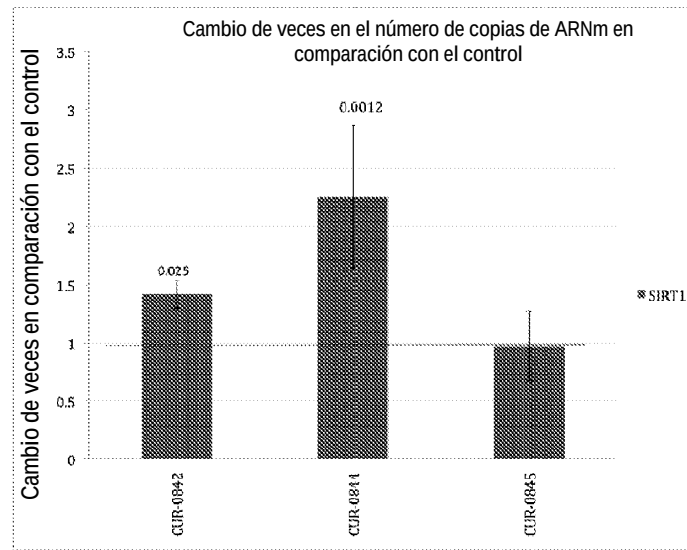


FIGURA 14

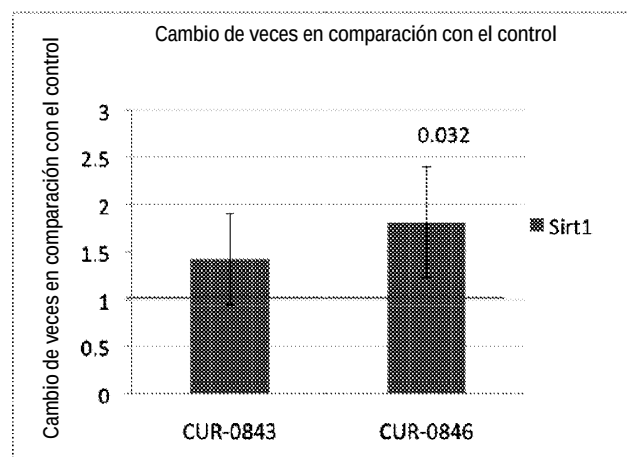


FIGURA 15

(SEQ ID NO: 1)

>gi|13775598|ref|NM_012238.3| Homo sapiens sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae) (SIRT1), mRNA

GTCGAGCGGGAGCAGAGGAGGCGAGGGAGGAGGCCAGAGAGGCAGTTGGAAGATGGCGGACGAGGCGGCCCTCG
 CCCTTCAGCCCGCGGCTCCCCCTCGGCGGCGGGGGCGACAGGGAGGCCGCGTCGTCCCCCGCGGGAGCCGC
 TCCGCAAGAGGCCGCGGAGAGATGGTCCCGGCCCTCGAGCGGAGCCCGGGCGAGCCCGGTGGGCGGCCAGAGC
 GTGAGGTGCCGGCGGCGGCCAGGGGCTGCCCGGGTGCGGCGGCGGCGCGCTGTGGCGGAGGCGGAGGCAGAGG
 CGGCGGCGGCGAGGCGGGGAGCAAGAGGCCAGGGGACTGCGGCGGCTGGGGAAGGAGACAATGGGCGGGCTGC
 AGGGCCCATCTCGGGAGCCACCGCTGGCCGACAACCTTGACGACGAAGACGACGACGACGAGGGCGAGGAGGAGG
 AAGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGATTGGGTACCGAGATAACCTTCTGTTCGGTGATGAAATTATCACTAATGGTTTTT
 ATTCCTGTGAAAGTGATGAGGAGGATAGAGCCTCACATGCAAGCTCTAGTGACTGGACTCCAAGGCCACGGATAG
 GTCCATATACTTTTGTTCAGCAACATCTTATGATTGGCACAGATCCTCGAACAATTCTTAAAGATTATTATGCCGG
 AAACAATACCTCCACCTGAGTTGGATGATATGACACTGTGGCAGATTGTTATTAATATCCTTTCAGAACCCACAA
 AAAGGAAAAAAGAAAAGATATTAATACAAATTGAAGATGCTGTGAAATTACTGCAAGAGTGCAAAAAATTATAG
 TTCTAACTGGAGCTGGGGTGTCTGTTTCATGTGGAATACCTGACTTCAGGTCAAGGGATGGTATTTATGCTCGCC
 TTGCTGTAGACTTCCAGATCTCCAGATCCTCAAGCGATGTTTGATATTGAATATTTTCAGAAAAGATCCAAGAC
 CATTCTCAAGTTTGCAAAGGAAATATATCCTGGACAATCCAGCCATCTCTCTGTCAAAATTCATAGCCTTGT
 CAGATAAGGAAGGAAAACTACTTCGCAACTATACCCAGAACATAGACACGCTGGAACAGGTTGCGGGAATCCAAA
 GGATAATTCAGTGTCATGGTTCCTTTGCAACAGCATCTTGCCGTGATTGTAAATACAAAGTTGACTGTGAAGCTG
 TACGAGGAGATATTTTAAATCAGGTAGTTCCTCGATGTCCTAGGTGCCAGCTGATGAACCGCTTGCTATCATGA
 AACCAGAGATTGTGTTTTTTGGTGAAAATTTACCAGAACAGTTTCATAGAGCCATGAAGTATGACAAAGATGAAG
 TTGACCTCCTCATTGTTATTTGGGTCTTCCCTCAAAGTAAGACCAGTAGCACTAATTCCAAGTTCCATACCCCATG
 AAGTGCTCAGATATTAATTAATAGAGAACCCTTGCCCTCATCTGCATTTTGATGTAGAGCTTCTTGGAGACTGTG
 ATGTCATAAATTAATGAATTGTGTCATAGGTTAGGTGGTGAATATGCCAAACTTTGCTGTAACCCCTGAAAGCTTT
 CAGAAATTACTGAAAAACCTCCACGAACACAAAAAGAATTGGCTTATTTGTGAGAGTTGCCACCCACACCTCTTC
 ATGTTTCAGAGACTCAAGTTCACCAGAAAGAACTTCACCACCAGATTCTTCAGTGATTGTACACTTTTAGACC
 AAGCAGCTAAGAGTAAATGATGATTAGATGTGTCTGAATCAAAGGTTGTATGGAAGAAAAACCACAGGAAGTAC
 AAACCTCTAGGAATGTTGAAAGTATIGCTGAACAGATGGAAAAATCCGGATTGGAAGAATGTTGGTTCTAGTACTG
 GGGAGAAAAATGAAAGAACTTCAGTGGCTGGAACAGTGAGAAAAATGCTGGCCTAATAGAGTGGCAAGGAGCAGA
 TTAGTAGGCGGCTTGATGGTAATCAGTATCTGTTTTTGGCCACAAATCGTTACATTTCCATGGCGCTGAGGTAT
 ATTCAGACTCTGAAGATGACGCTCTATCCTCTAGTTCCTGTGGCAGTAACAGTGATAGTGGGACATGCCAGAGTC
 CAAGTTTGAAGAACCCTAGGAGGATGAAAGTGAATTTGAAGAATTCACAAATGGCTTAGAAGATGAGCCTGATG
 TTCCAGAGAGAGCTGGAGGAGCTGGATTTGGGACTGATGGAGATGATCAAGAGGCAATTAATGAAGCTATATCTG
 TGAAACAGGAAGTAACAGACATGAACATCCATCAAACAATCATAGTGTAATAATTGTGCGAGGTACAGGAATTG
 TTCCACCAGCATTAGGAACCTTAGCATGTCAAAATGAATGTTTACTTGTGAACTCGATAGAGCAAGGAAACCAGA
 AAGGTGTAATATTTATAGGTTGGTAAATAGATTGTTTTTCATGGATAATTTTAACTTCATTATTTCTGTACTT
 GTACAACTCAACACTAATCTTTTTTTTTTAAAAAAGGTAAGTATCTTCAATCAGCTGTTGGTCAA
 GACTAATCTCTTTTAAAGGTTTCAATTTGTATGATAAATTCATATGTGTATATATAATTTTTTTTGTGTTCTAG
 TGAGTTTCAACATTTTAAAGTTTCAAAAAGCCATCGGAATGTTAAATTAATGTAAGGGACAGCTAATCTAGA
 CCAAAGAAATGGTATTTTCACTTTTCTTTGTAACATTTGAATGGTTTGAAGTACTCAAATCTGTTACGCTAACTT
 TTGATCTTTTAAACAAATTAATTTTAAACACTGGCATTTTCCAAAACGTGGCAGCTAATTTTTTAAATCTCAA
 ATGACATGTCAGTGTGAGTAGAAGGAAGTCAACAATATGTGGGAGAGCACTCGGTTGTCTTACTTTTTAAAGTA
 ATACTTGGTGCTAAGAATTTTCAAGGATTATGTATTTACGTTCAAATGAAGATGGCTTTTGTACTTCTGTGGACA
 TGTAGTAATGTCTATATTGGCTCATAAAATAACCTGAAAAACAATAAATGCTTTGGAATGTTTCAGTTGCTT
 TAGAAACATTAGTGCTGCTGATCCCTTAGTTTTGAATATTTGCCATTGTTGTTTAAATACCTATCACTGT
 GGTAGAGCTTGCAATTGATCTTTTCCACAAGTATTAACCTGCCAAAATGTGAATATGCAAAGCCTTTCTGAATCTA
 TAATAATGGTACTTCTACTGGGAGAGTGTAATATTTTGACTGCTGTTTTCCATTAATGAGGAGAGCAACAGGC
 CCCTGATTATACAGTTCCAAAGTAATAAGATGTTAATTGTAATTCAGCCAGAAAGTACATGTCTCCCATTTGGGAG
 GATTTGGTGTAAATACCAACTGCTAGCCCTAGTATTATGGAGATGAACATGATGATGTAACCTTGAATAGCAG
 AATAGTTAATGAATGAAACTAGTTCTTATAATTTATCTTTAATTTAAAGCTTAGCCTGCCTTAAACTAGAGATC

ES 2 845 644 T3

AAC TTTTCTCAGCTGCAAAGCTTCTAGTCTTTCAAGAAGTTCATACTTTATGAAATTGCACAGTAAGCATTATTTATTTTCAGACCATTTTTGAACATCACTCCTAAATTAATAAAGTATTCCTCTGTTGCTTTAGTATTTATTACAATAAAAGGGTTTGAAATATAGCTGTTCTTTATGCATAAAACACCCAGCTAGGACCATTACTGCCAGAGAAAAAATCGTATTGAATGGCCATTTCCCTACTTTATAAGATGTCCTCAATCTGAATTTATTTGGCTACACTAAAGAATGCAGTATATTAGTTTTCATTTTGCATGATGTTTGTGTGCTCATAGATGATATTTAAATGTGAAAAGTITGTTTTAAATATTTTACAGTTGAAGACTGTTTTCAGCTCTTTTTATATTTGTACATAGCTAGTCTTTTTATGTAAATTTTACTGGCATATGTTTTGTGACTGTTTTAAATGACTGGATATCTTCCCTCAACTTTTTGAAATACAAAACCGAGTGTTTTTACTGTACACTGTTTTAAAGTCTATTAATAATGTGCTATTTGACTTTTTTCTGTTAAAAA

(SEQ ID NO: 2)

zhg18_knownGene_uc001jne.1 range=chr10:69321166-69348149 5'pad=0 3'pad=0
strand=+ repeatMasking=none
GTGTCGTGTTTCATGTGGAATACCTGACTTCAAGGTCAGGGATGGTATTATGCTCGCCTTGCTGTAGACTTCCCA
GATCTTCCAGATCCTCAAGCGATGTTTGATATTGAATATTTTCAGAAAAGATCCAAGACCATTCTTCAAGTTTGCA
AAGgtactatgaactctctcggtgtttcttcttgccctctctcatgaaaaagttattttgttccatcacgccc
ttaaggttatcggttcattgtttatgataaagtgaatgctctgctactgtggcggaagatgaagtcactcattatggctaga
attcctttatctctagagaggactattatctacttcttttagagtagtgacttattttcaagagatggtcatt
atttttaaaatttgcactgcagcgatggctcgttattctgcctgggcttttttaaggaggtttgcacaccatataaa
agtaacataactcttgtagtttttaattttatttagagattgttaaaggttataacatcaacttttgggtgtttcgtagt
caaggttttaacataaagtagtgcctgaaaaatcattttgtaattagagaatgggaagattcttgggttgcaatttt
gtcgacaaattgcagaggacattattctgctctagagttgcacccgctcagatcagaagccactagccacatgtg
gctgttgagtaacttgaaatgtattgatattgtgcaataagtgtagaagacatttggatttttagagatccagtatg
gaaaaacaaagattttcattagttttattctcatcaaatataacaaaattatgggtttttatatggaaaaaact
taaaatlaattttgaattctttgaaatactttgatatttgggttttaataaaatgatatttttgggctgtgcgtgtt
gctcatgctgttaatttcagcaactttggggagcccaaggtgggaagatcagttgagccaggagtttgagaccag
cctgagcaacataatgagactccatctctacaaaaataaataataaaatttgctgagcatgggtgggtgtgcacctgt
agaccctaccactcagtagtctgaggtgggaagatcccttgagctcaggagctcaagactcagtggaacctgatc
tgccattgcactccaccctgggcaacagagcaagagtggtttccaaaataatgtatgttttttgaaagtttaacttt
ttttttttttcttttttttgaagaagtcttcttcttgcctccaggctggagtgcaatggcatgatcttggctca
tagcaacctctgctcccagggttcaagtgattctcgcctcagcactcctgagttagctggcaggttacagcgccgcg
ctaccatgcccgactaaattctgtatttttagtagacagagggtttccaccaggttgccaggctgtgttgaaat
cctgacttcaggtgtagccacctctcgcctcccaaggtcttgggattataggcgtgagccaccgcgcctggcc
agttttcaccttaatgtgggttactaaacaatttaaagttatatgtatgtctcacattatgtacctattgtacagc
tgtgttttagcatagaaagtttaataatgcatcacaccattctcaagagattgagtcattagaaaactgtttctct
ttctgttatttcagtccttttgaagaagaattacaaaatttggattgtttaaacttggaggtatataattttgaa
agtagcttttttttttttttttcttaagtgcggggatacatgtgcagaatgcgcagatttgttaacataggtata
atgtgccaatgggtggtttgtctgcattctcaacctgtcatctaggttgttaagcccaacttcattaggtatttgt
cctaatgtctttcccaaccttgcgcccaacctcctgacaggcctctgtgtgtgtgttccccaacctgtgtccat
gtgttcttattgttccaaactcacttatgaatgaggacagtggtgttttgggtttctgttctgtttagtttgc
tgaggatgatggcttccagcgaaggagctctgtatttagtggctttttcccaacctaatcgttagaagtttgtgaat
agggactctcttaatgaatccagaagtttaatgaacctagcttttttttttttttttttggagacggagctctggct
ctgtttcccgagctggaggtgtagtggtgtgatctctgctcaccatacaacctccactcccgagttcaagagatc
ctctgctcagcctcccgagttgttgggactacagcgcgctgtgcacgtcgtgcgttaattttttagtatttttg
tagagacggggattcactatgttggccagggttggtcttgaactcctgacctgttggtcgcgccatctcagcctc
caaagtgtctgggattacaggtgcgaggcagcgcccgccgctgcgatgaacctaaatttttaactaaacagt
ggccttatctactttcagaccatttggttatattacatgactacaggagaagcttgctaattcagaataaatt
tgttactaaattggcgactgtctttaaaaaaaagtgatttttggtagcagtagctgtgcctcataatccag
tgctttgggaagctgagataggaagatctcttgaactccggagtttgagaccagcctgcgcaacacagtgagacc
ctaactcactacaccctccaccatgtgaacttttggtttttaccaggttgtggtatattaaatggggacttagtgt
aaagtgggaaaaattatattaatcttgaattgatattactaaactgaatttgaagaagttttcaggctatcaagaga
atttttaacttaaaactatataatttgaactttttacttcatatcogtataatgatgatgtgtctatctatctata
gcttttagagcagacaactgggttcatactggattaaataaataatgtaaagttattttttgttaattatggatt
agtgaagatttactgttttaacctactcctgctagtggcactatcgtatggttttgaagacagtgagatgtac
ttaaaggtttcttgaaattggagctaggacactggcattataaaactccacagtagcgcagacattgacactca
agaagaccagcaagtaactagaagttactttgatcttaataactacaaaaaacttgactcactagttattggag
atacatttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
taaaatttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt
tcggctcactgcactcccaactcccggttcaagcaattctcttgctcagctcccaagtagctgggactaca
ggcactgccaatcagcatcagcacttttagtagagacggggtttcaccatgttggcaaggacgtgtctcgtcgtg
acctcgtgatccgcgggtttcagcctcccaaggttggggattacaggttgtagcccaactatgctcagctgataaa
tttaattttgtcttctgtagttttcattatttgtaattggttaaatcaggtctaggtctttagctgtgttactacata
taattcttggctcatcttaattctcactatgggaactgactaaaaaagaagaagcttcagctctgggcagact

gctcacacctgtaatcccagcactttgggagggccgaggtgggtggatcacctgaggtcaggagtccaagaccagc
ctggccaacacagcaatacccgctctctaataaaaaatacaaaaatcagccaggcttgggtggcggcgccgtgtc
gtcccagctacgcaggaggtgtagacggggagaattgcttgaagccaggaggtggaggttgcagtgagccgaaaag
cgcttaaggagaaataagtaaggacaaagagtgtaggtatgtagctgacacggaggatggggaggggtatgtaaa
tattgtcgataattttactgaatttctaataattacaagaatagaatattcataggataaccctaagcttttctgtg
agtcagtgtagtaggcagaaagttcactaaagtgggttatgatttttgcacttatgagaaaacattaaaaatga
agccatgaaaaggaaatattgggtgaaatttagatacttcagaaggaaagagagacttttcttttttttttggaaaag
aatttctataccatctatttatatcattgtattgtgattattgagaattaaactgtttttttttttttttgttt
tttttttttgagacagttttgtcttgtcaccaggtggagtgccgtgggtgagatctcggtcactacaacctt
cacctcccgagttcaagcaattctgtctgctcagtcactgagtagctgggattacaggtgcccacaccagcc
cagctaatttttctaatttttagtagagacgggatttcacacatgttgggtcagggtgggtctcgaaactcctgacctca
gggtgacccgcccgttaggcacaaagtgtctgggattacagggcgtgagttctccacgcccagcccttaaatcttatt
tagactggaaaatttcaagtaattggagaggtgtgttaaggaaagtattgtctgttagagcagtttcttaaatgtg
gcactattgacattttgggctggatttttcttttgggttctgagatagtttctactctgtcgagccatcacagctc
gttgcagccttgaactcctgggctccttgaacaggaggtcctgctgagcctcctgagtagctgagaccatagg
cctgacccatatacctagctaaatgtgtttttgactttcttttcttttctttttagagtgcaagttctcactattgtt
ccaggctgggtcttgaatctctgggttccagcaattctctgtctagccttacagagtgctgggattgttaggcata
ggccactgaccccgcccttgggctgatatatttattgtctatggggaacttctctgtgctgttaggattgtttggca
cttgaggtctgggagttcagaagagacagcccaacatggtgaaacctgtctctactaaaaatacaaaaattagcc
gggtgtggtgacacacatgagaatcacttgaactcaggaggtgagtttgccgtgagctgagatcgccgtgtgtgt
actccagcctgggtgacaaaagcaagaatctgtctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaattcgctgggtctcca
cctagctttgtatccccaccacagtcctgacacataaaaaatgtcttcaaatgttcttgcaaaattgctcatt
gaggttaactgaggtgggtcacaactttaatcccagccttttgaaggctgaggtggcagatcacttaagccca
gggtgactggccctggccaaacttggcaaaacctgtctctactaagaatacaaaaaatagccagacgtgggtgtgc
acacctgtaattccagctactcgggaggtgagggcagcagaatcacttgaacctgggagggcgaggttgcagtgga
gcagagatcgaccactctactccagcctgattgacagagtgagactccatctcaaaaaaaagaaatattctct
ctgagcaccagtggttacagtggtcttagctgtggtaccactttggattctttcacacaagaacagtttaaggcc
agttttaaagctgtggggccatttctgaactgtattttgttttttttttttggagatgaagtttctactctgtt
gctcaggtggagtgccatggtgtgtagctcgggtcacttgcacacctccgctccaggttcaagcaatctcctgc
cttagcctcttgtagtagacttgattatgggacttgggtcactgcaacctctgcttcccaggttcaaacagttct
gcttagcctgctgagtagctgggattacaggtgcccgcacacatgcttggctaattttgtatttttagtagaga
cgggggttccacatattggccaggtggtctcgaaactcttgacctgtgattccacacctctgctcccacaaagt
actggtattacaggtgagccactgtgctcagcctgctcagccttttttgaatttttagtagagatggggttctcatgt
tggccacgctggtctcgaaactcctgacctcaggtgtagccacccaccttggcctcctaaagtcttgggattacagg
cgtgagccacttcgcccagcctgcaactgtgttcttatctgcataatgacttaaatgataaataagttgtgtgtca
tgggtctcagaaaacctaaaaataattcactgatgttaataaaaaatgagtggtgtatttagagtgcaaggcgaaact
gaattaggtgtgataaaaaataacttttttttttttttttttttttaagttagactgttgttcggctggcgctgt
ggctcagcctgtaatcccagcactttgggagggccacagcgggctgcaaaagtgttagaccagcctgaccaaca
tgggtgaaacctgtctctactaaaaatacaaaaaattagatggatgtgttggcgcatgctgtaatccagcctactc
aggaggtggaagcaggagaaatcacttgaacccaggagggcgaggttgagtgagctgagatggccacactgcaact
ccagctggcgagagagtgtagctgtctcaaaaaaaaaaaaaaaagaaagaaaaaaagaaagaaagaaagaaagaa
actatgttgcgaagagtgtagtttctgtccatactgaattcactgttctttccctagtgtattaaaaatacaagaaa
aggttaggggagaaaacagcaactgaattttatgaacttaattccaagaatgtattttacatttgttcaaaaaat
tattacttttattgataaatatgcaaacataaccagattatgtatttaattagttaaaaattttagttctagaacaaact
tattaaaaatcaacgtcagtaaaaaagaaatagatggtagtcacagtgccattcatctgaaaaataatgttttaatt
actcaacatgtatatgtgattatatactatagctttatagtagttgttagctggatttatgtttacatttttagcata
aaatttggcttttgcctgggcccagtggttgcgactgttagtccagcaactcaggagggtaagggtgggaggattg
cttgaacccaaagagttttaggctgcaagtgagctgtgacctcactctgcacaccagcctgagtgacagagcaaga
cccatccctgaaaaagaaaaaacttggctgttttacttttgcctttcaattttagtagtatattctacttaataataa
acttactttctgtgaggtgcttgaatactttttaaaggttatttatgaagtggtgaactgtaattctgtatttgt
acatttggatgtacaaatagtggttgcacagttgtccttttttgggtatgtctccagtggttcttaggataaattcc
tgaagtgtaatttcagtttttgaatttcagagaaaacatgtcaaaagtctcttctttaaagcctttagctcctgatat
gttttgtcgtattgcagcttggaaaaggttgaataaaaaatcctctattagggctgggtgcagtggtcctgctgt
aatccgagcactttgggatttagctgatttggctgatttatcatgccactgcccactgtatccaccacaaatcca
caaaaaaccaggatacattcttagcattaaaaaaagttatataaataataataattatataatttttagga
caggctcctgtctgtatccccagagcgtgtgcagtatctttcaaaaatcatatataatataatagtttggcccttc
cttcagttcttgcctgcccctaataatctgtccttaattggttaccatgggtgaaactcttggaaaatcattcaggggga
aaaaaaatttgtgttgggataggggagggatgtcagcataagtttttaatacttgataaatgattggcaacagaa
tcaaaaacaccttgttttctatctttttcaccatataaataattcttgagaataatttcgtaacagcacttaacag
atataccttatttttcaagaaggctgtgttagcattctatttttaaagttgttttcacagtatataggtctcctatt
gataggtatctgcatttttgcctttttagcttaggggtgtttttaaggcagtttaaaaactatagtaagtaaaaag
aggccaggtgcggtgggtcacacctgtaaacccagcactttgggagggccgagggcggtggatcacttgaggtagg
agtttgagaccagcctggcaaacatggtgaaaccttctctactaaaaatacaaaaaatagccggccggtgggtg

caagcgccgtgtagtccagcgtgttcggaaggctgagggaggagaatcgcttgaaactcgggagggcgagattgcag
 tgagccaataatatgctgctgtactccagcctgggcaacagagcgagactctatctcaaaaaataatacaat
 aaataaaattataaaaaataaagcagcaccagcctttatTTTTTATTTATTTATTTATTTTgagacagagtcgc
 attctgtcgctcaagttggagtgagtggtgccatcttggtcactgcaacctctgctcccggttcaagtgtat
 tctcccgcttcagcctccaggtagctgagattacaggtgtgtgccaccacgcccagctaatttgtatttttagt
 agagatgggggtttcaccatgtttgccagcgtgttcttgaactcctaacctcaggtgatccgcccaccttggcct
 cccaaagtgtgtgggtttataggtgtgagcgcgcgcgttggctcaacatcttatgtttgagacgggtctcctt
 ctgttataccaagctggagtgtagtgatcttacagctcactgcagcctccaaactcttgggctcaaatgatt
 ctctgtctcagcctcccaagtagctagtactacaggtgtgcaccaccatgcctgtgttcttgttttttt
 atatggacagctcttctctatgttggccagcgtgtctcaaaactcctgagctcgagtgattctgctgcctcagctac
 tcaaagtgtgtgggtttagtgagcgttaactatcaggttaggcctgttctgtttttattagcgtggatgactgtgtg
 ttactactggcgttctgtatatccttgaattacctcttgttttttagccatttttctccatttgggtgcttttct
 acagtgacttctgggaatattatgttcttttcttttgatttacctttcaaaatTTTATTTTATTTTgatatataata
 gttgtacgtgtacattatattcttgaagagttaggcttattgggattccagcctttagtagtcccatggaagt
 gagcaaaactgaaatgtacttactagtcttagtcatttggttcgtaatatgtaatagaaatgggtgcttatcctaaa
 agaaaaatagaaaaacttgagggtgaaggatcagaaattgaagacagtaaaactgcatagaggtttaaatgtag
 gggttttaggttttctttttttttgagatagcttctgctgtgacaccagggctggactgcaacctctgttccctg
 gcctcagcgatcctccaccttagcctcctgactagctgtgaccacagatgtgaccaccatgcccggctattt
 tttttgtatttttggtagagatggggtctcgccatgttggccagtcagtgctggattttcatatcaaaacagg
 gctctgtacttacttctcttctgtgaccaaattggcaagttagggtttgttttgtattttgttttcatctgcacog
 ggtatattgttcacagctggatcagcaaaactttctgtagtaaggtagggcctggtagtaaatatgtatgtatt
 gcagactgcatagggtctctgtcatatgttcttgttttctttacagccttgaaacaaataaaaaacccagctctt
 cagccttgtctgtgacataataaagaggaaattaaaagtgttattgttatacgtggtagacatacaaaatTTTatta
 agtggcgactggcagtttaactaattgacattctcttgtgttaggttaatacaggggttggcgtagctatggcctc
 agtccaaatgtggccactccatgtttttgtataggctgtgagctaaagcattaaagcattatttactttaa
 caacaaataaagtTTTatgtgtgtacaacatgatgttttgatgtgtgtacattatggaaatggcctaactcaagcta
 atattcttacttccacatacttttttttgggtggtagaacaatttaaaatgtactcttaataattttcaggtatac
 aatatttgtttttgtttttgtttttgttttgagacgaagtctcgtctctgtctccacaggtggagtgagtgccgc
 tatcttgggtcactgcaacctccgctccaggtacaagcgattctcctgcctcagcctcccaagtgtgtggat
 tacagcgccgtgtctccacgcccggctagtattttagttaaagacaggggttccaccatgttggccagggc
 tgggtccaaactcctgacctcaggtgataccgctgctcagcctcccaaagtgctgggattcagcggtgagcca
 ccgcgcccggtacaaatatgttcttaattatagtcagcaatagatctcctgaacttattcttccacgctctcc
 caatccacccctccacccctgtctaataattttaaagtactggggaaaaaattgaaagaactgtttcatgac
 acttgacattatataaaaaattttcatgtcagtggttctataatacaaaacttttattagaacatagccatactattt
 atatatgaaatacagttgaatttgtcatatgaccaatttattagtagttagttagatgttgagcagtttatttca
 agtgtgtgttttgtggaatgaagagacagggaggtatttaggactctccttagcaggattgatgcatttcaact
 tttttgacaggaaggaagttaggttctattttctcagcaactctacttaactgcctccatctgaactatata
 aggaggggttggatatacagcaaaagattaaacatcagtaaaatttttagtaattctctaaaaattctgatttttaaag
 agggaaattttggctgggcacagtggtctcacacctgtaatcctaagcactttgggagggccaaggcaggtggatcac
 ctgaggtctgtgagtttgagaccagcctggccaacatgttgaaacccctgtctctactaaaaacaaattagctgaat
 gtgggtggcgccacctgtagtccagctccttgggaggtcaggtgggagaattgcctaaaccaggagaggtgg
 aggttgcagtgagccgagatttggccattgcactccatcctgggtgacagagcgagactctcaaaaaaaagggtg
 ggtgtgaattttgttatgttgtgctgggtggagtgtagtgcccatccattggcacgatcatagagtactacagct
 ccttaactccagactcaagtgttctcctcctctgtctccacagtagcaggaaactacaggcctgtgcccacat
 gccagctttcttagtcttggaggtgacatttacacctatgccttttactctagggtcttttattcatattgtct
 agaaatttggagaagaaagaaaggcataatctctgcagaaaagccattatttctgcagatagttcttttttttt
 tgagatggagttcttcttcttgcacccagcctggagtgagtggtgtgtatctaggctcactacaagctccacctcc
 tgggttccagccattctcctgccttagcctcccgagtagtgaggactacaggcaccgcccaccatgcccagcta
 ttttttttgtatttttttagtagagacgggtttccacatcttagccaggtaggctctcgatctctgacottgtga
 tccgcccacctcggccacccaagtgttgggtattacaggtatgagccaccacatccggccaatttctgaggatag
 ttctaagcttttagtttgaccacgttgggtgcctatggccaattcctggattatttgcagtgttccagacacagc
 tatgtgaaagcaggggttgttttaatagtgttttgagcctttagttccagttctgtctccactcttggctataa
 ggatccctatggcagcaacagaaatggcccagccctcatgattgggtgtctaaaaaggctttaggatattcaaaact
 ggggtggcctgtcttgtttggaataggactaagcatgtcacactttccaccatggaagagtttaacatattctatc
 tgtaagttgtatctccagtcattgggttttcaacaagtgttgcctatcttaggaggtgggtatattagaacagtc
 ttccagagtaatttttttcatattttcagatttttttagttttttttgttttttttttttttttttttttttaaag
 gctctcactctgtcaccagcgtggagagcagtgatacagatcatagctcactggaacctctacctcctgtggctc
 aggtgatcctccacctcagccttctgtagtttctgggactacaggcatgaaccgtgaggccagctaatttttgt
 gatttttgtgtttttttagagtcaggggttctccatgttggccaggtgggtctgtagctcctgtgtcaagtaa
 cctgcccgcctcggccttccaaagtgtgggttagaggtgtgagccaccacactgtactactacttttagttt
 aacactatattttaaactaataattcagacatggccatttctacttgacagaaagtatgagtc aaagactcaa
 atcattcagattctcacatatgtaaaacgtacgcttggccgggtgagtggtcagcctgtaatccagcactt
 tgtgagaccaaggtggcggtatcacctgaggtcaggttcaagaccagcctgaccaacatggagaaaccccgctc
 tctactaaaaatacaaaaattagctgggtgtgtggcacatgcctgtaatccagctattcaggaagctgagggcag

agaatcacttgaacccgggaggtggaggttggtgagctgagatcgcgccattgcactccagcctgggcaaaaa
gagcgaacctctgtctcaaaaaaaaaaaaaaagcaggcttataaaaaaaacaaaaatgtcccttatgatttgt
cttaaaaggtagttgaattaataagagctaaatctagtgcccatacatctttgtgtttcttactctaccctttag
aaaggggtggggtggacgtggataaaggcacacagtttaattcagggacggtggagtccttggtacttgctcttttcc
cctgacottgcttttgagttatttttttttaaatctgcatttggcatgctattatcacttgcttactattat
aggtcctattttatctgttgcctagcatattctcatagtgccctaaaaactcctaaaaagctatttccagagggagc
tttaatgagacatacaatgcttaatctctcaaatgtaaatgtactagaacaaagcattctggggaagaaaaacagt
ggttgatttaactgaactcactttttccaaaacagtggttttgattttctgttaaacattgacttttataagcttt
tcccttgctactatatgcactctctattttcttaaatgcaaaagatttattcatgaaatttgtgataaatatttga
atctaaaggcaacgttttttgattctttatacagaggtttttagcagcatgtgtacatgtatgtgatagctgttaac
ggaattcacttaagttttacttagaagcctgggtagtagaacctagaagttgcagtggaatttttttttaattt
gaaagattaaataggtaaaaagtcacttttaatctctattaaactttttgtataatgtcagaagtgaaagtctcc
ccacatctgcttacagcctgtttgtatccttctgacttgattgattaaatggacatctctatatatacatatgcat
ataatttcaatttttgccttaagtaacaaaaacaaaagttacacatactggtgactaatttgccttttccagctatg
tcatgaaccattttccagggcagttcatctagatctccctcaattcttttaaatggctacatatttccactattat
ggatgtaccatatttatacaacgggtccctatttgatggacataggttgtgtctagtttttgttagcattgtg
atagattagagcctgtaatgaatggtaaggaagtaagtagatgatagcactactactttgaaggaaaaagtagag
aataaacttcccttggcatagtcacttactaaatggaatttaataaaaacactgtcaaaagttgggaggacaaaa
attgtactttttctctgatctttttgcatgtgtatatctgaattctttgtttttaaagAAGAAACAGCATTTGA
AGCATTTATTTGGGGGAAAAACACACACACAAAAATCCAGCAACTCAGCATTTCATGAGCAACTCTATACTATACCA
GTATGTGCCTTGCGAGTGGAGGAAAAACATTTTGgtaaggattaaaaacttttagctttaaacttccagcaggttg
atattctaatgaatgataaatcaaaaaaaaaattttaaattattctgtattgacagtgctttttttttaaaccac
cctacacttgatatctgttaatttttagttttaaactttcccatttttcttttaaagaaaaaatctgaaatttgcagcca
acaaaaattagatatcctaaaggttgattacttctgacttttataaaatatcaacatttcttagagatgtttat
gggcccagctttgtctttttcttcaaggggccaagttcactaattgtctgagttttatgcataatgacagcaacccgctc
ctttttaggtgtgtgtgcacatctagatacttttaaattgctcatctatttctttttaaatttatgtgtgt
gggattatcagatattttttgttaacatagacatctgtagtttatttccactaatgtaattttttctacatt
tgcttgatacagGAAATATATCCTGGACAATTCCAGCCATCTCTCTGTACAAATTCATAGCCTTGTCAGATAAG
GAAGGAAAACTACTTTCGCAACTATACCCAGAACATAGACACGCTGGAACAGGTTGCGGGAAATCCAAGGATAATT
CAGTGTGCATGgttagtaaaacttcagagtggttttctgtatttttagttttataggaagatatctctataaa
agctgactgcctcgagaagtgagataaagcattatttlaatcatgttatctcatattatcgataacctcagaaaa
gtagaaaaacaaaaataataaaaacagaagtatttggccttgacagtttaattatagaaaacctcagatattaatttg
cttttgatttcaaaagatgctgcagttgcatgcatcattatttttaataaatcttttctggctgagtgagtggtg
ctcacgctgttaatcctagcactttgggaagccgagggcagatcccatgaagccaagagtttcgagaacagct
tggccaacatgggtgaaatcccaactctactagaataactaaaaattagccgggcatgtgtggcagggcgcctgtaatc
ccagctactcagagaggtgagggcacgagaaatcacttgaacctgggagttggaggttgcagcgagccaagattgca
ccattgcgctccagcctgggagacagtgagactctgtcaaaaaaaaaaaaaaaaaaagaaaaagaaattctgaata
caagagtagtattagctgttaattgaagaaatgtgacatcttttagttttatgaaactaaaagaaactggatagttgag
atgtacaggatttcagagatttcagaaaatgtttaaaaacaagtatcaacaggccattaggtatctaaagtgtttctaa
gaactgccagctaaaggttaataagagttggaactgtccaaactctgcaggatttttagccctggaggagtgagctgtt
acagttttgttgaaaaagtagcttttagaaggcatcattatatattagtgctcagagattgagaatcatattcatt
ctatgtataaaatatataaattcttccatccctagattctcctgtagtatatcacaaaaatctgcagtggtctga
ggtttaaaatcaaagttaaaaacaaaaacaaaaatccttaaaccctcttaacatttgtgatgttaaaactttataa
cgttttgtgtgtgttcaagaaacagaaataacttcttaataaaagcatatatatgtttgtttgttttagGTTCCCTT
TGCAACAGCATCTTGCTTGATTTGTAAATACAAAGTTGACTGTGAAGCTGTACGAGGAGATATTTTAAATCAGgt
aatttgttgcccatatttttaggaattgttcatgtctctgaagtatttctcttttgcctcaaaatccttttttac
ccctttaaagtatatattgttacagaaagattcaggaagaaaaatagttagcatttgggaatttttggtaaaaatcac
gagaacctttcaataccttatatagaaaaacagccctataaaggtcttcaaatatgaaattggcttcttagtat
ctaagcogaacataaaaatgtcagatcataagcaagttgttgttgtagtagtttttctccttctcctccttttttg
tgctgtcagatttggaccttaattagttatggtaactctaaaattatttcatacatgttcatgtccaaaaaata
taggaaaaatttggcagaaaaataaaaattatccagaaatattgtcctgtgtgcttagcaatatatggaggtaatcat
gtcattacgaagaggaagaaatagtatattaaaaatggagtcatttggcgggtgcagtggtcatgcttgaatcc
cagcactttgggaggaagaggtgggtcgatcatttggaggtcagaagtgagaccagcctggccaacatggcaaaaac
ccgctctctcttaaaaaatacaaaaattagcctggcatgttggcatatgcctttaatctcagctgcttgggaggtc
gaggcaggagaattatttgaactcgggaggtggaggtttagtgagctgagatcatgccacttccactccaggtcg
ggcaacagaacagactccatctcaataataaaaatggaatcattttatttgacaaatgctcatttttttttga
aaggatcaatttccatttagtgtatatatacacacattatgttttctcttaataatgatggactcttcaatgtc
aagtgtttttctacatagatatattataacaagagcatagtatttattgttttcatagtatgttaataaactaccca
tcattgacagttgtgtttatccatagcttttctgttttgtttttttttaaataattctgaaatgtattcttaga
ggtatggaaaatgttgactatttetaacttgggcttactctttgtctctcactcaacaaaaatctgaaaaatag
tagGTAGTTCCTCGATGTCCTAGGTGCCAGCTGATGAACCGCTTGCTATCATGAAACCAGAGATTGTGTTTTT
GGTGAAAATTTACCAGAACAGTTTCATAGAGCCATGAAGTATGACAAAGATGAAGTTGACCTCCTCATTGTATT
GGGTCTTCCCTCAAAGTAAGACAGTAGCACTAATTCCAAgttaagttgggtgatgggttttgggagaacatttctat
ataaatgtcatgggttgtgggtctgtataaatagacgctagtaattcttaactctgcttctgtttgaaagagtggt

gaagagctaatttttagaaattgtttgtttgtttgtttattgagatggagtttccctcttgttggccaggctggag
 tgcagtcgcataatcttggctcactgcaacctccgctccgggttcaagcgattcttctgcctcagccttctgag
 tagctgggatcacaggcgccaccacatgcctggctagttttttagtatttttagtatagaccgggtttccaccatg
 ttggccaggctggtctcgaactcctcagctcaggtgacccgctgctctgccttctaaagtgtctgggattacag
 gcatgagcccccagcctggccagaaattctttatttttagtagagatgaggtcttgttgtgtgcccaggtgg
 attcgaactcctgggctcaagtgtacccctgcctcagcccttgagtagctaggattacaggcacgagcctcca
 catctggctgaactgttttttaggtggcattgttcattgagactggtgaatctgacatttttgatgggggtgga
 ggggttgcataaacgcaagtaattgttggctcgtgctgtaatctcagcaactttgggagggcgaggtagtgga
 tgcgttgagggcgagcagtttgagaccagcctggccaacatggtgaaacctgtctctactaaaaatcaaaaaatt
 agctgggcatagtgtgtgtcacatgtagtcccagctacttgggaggttggggcatgagaatcgcttgaactcagg
 aggcagaggttgcaatgagccgagaaatgtgccactgcactccagcctgggtgacagagtgaggactctgtctcaaa
 aaatcaaaaaacaaaccagaaagtaattgctaaactctacttctaatttatgtgaaaaattaaagacaaaggtagagt
 tcaacttagactttttgttgaatgtgttttaattgttgaagggttagcatcaattatgaaatgttctct
 ttatccttataatttttgattacagttttgatcttcaaatttaattgatctacatttaataaattcaaatgtta
 tagtttggtagaagtgtacataccatgtaagatggaaatttgggggctcagaatgattggttcatcttctgtagta
 acagcatggcataacgggtgatgtgtgatatagtttaccctaaagggtgtgtatataaaagtgttcacataaaaa
 tttaaatccttattactctcaggaaaatttcttgtcctatataattctcactgtctgttccctcctctagttt
 agaatcagaggaggagagagagatctcagttgcatcagatgtgtccttctcaatgagggaaagagggagagg
 aaaaatttaaatccctagccagagaattgaattagaccacacatcagcagtcaggcagcagagtaaacagtt
 ggaagaaacatggagtcgaactcttcaattttgtgtctatcccatatctcgtggcttttagcagtttaactcagtt
 tacctaattagctgtgaaattctgtttaaagtagaatacaagacaatttgcatttaaatgaaacatgaaaatttaa
 tatacaaatctcttgttctttagttgtcttctttaaagcaaaatcaaggcactctgtcttaaaagcttttctt
 ttatttttagagacgggtgtcttctgttagctcaggttagagtgagtgagtgagttcagctcactgcagcct
 tcaactcctggggacaaagcagctccttccacttcagcttctcagtagtttaggaccagaggcgacacacatgcttg
 gcaaattttttaattttttttttagaagacgggattcactttgttggccaggctggtcacaaactcctggcctca
 agtgatccttccctcctcgtcctcctcaagcattaggattacagggcatgagctaccatgcttggcttcaaaact
 ttcttctcaaaagcttctcgtgggtagatgtagtgttgcgaagataatataaaaaagaaacaggtttataata
 gcgtagaataatgtttatagacttttccctccccccctccccctccctccctccctccctccctccctccctcc
 attcatccttcccttctgttagtcttccctctgtccatccttcccgctcgttcttcttccctccctccctccatc
 cctcctcctcctcattgcccaggctggagtgcaatggcatlgtatcgggtcactgcagctcctccgtgttgcagag
 ttctcctcccaagtagttgggattagaggcatgcgctaccacacgcccggctaattttgtgttttttagtagagat
 ggggtttccaccatgttggctgggttgggtcttgaactcctgacctcaggtgatccgctcctcggcctcccaaa
 gttcgggattacaggcggtgagccactgtaccagctcacttcttataatcaggagctacttaagtagaacattt
 atgtaccaagaactcttctgtgacttgacttaactcatttaactcctcaccacagctcttgggagaagtactatta
 tcatccccattctgcagacaaggaaatttgaggttcagagtgaggaaagtctgggaagattgctcaggggttaacca
 ggtgataggagcagaacttgagcgttttataaaagacacttaactgcccactgtcttgccttgatgaaatgtaagt
 gcttgggttaagtatttagtgcatgggtctttttgggaatttggagctcaagcccttgggtattttgcaataat
 gtatctgttgtgtgttttattagcttacttccctcctcccttttttctaactcttatttttccacctatttttagGTT
 CATACCCCATGAAGTGCCTCAGATATTAATTAAATAGAGAACCTTTGCTTCATCTGCATTTTGATGTAGAGCTTCT
 TGGAGACTGTGATGTCATAATTAATGAATTGTGTCATAGGTTAGGTGGTGAATATGCCAACTTTGCTGTAACCC
 TGTAAAGCTTTTCAGAAATTACTGAAAACTCCACGAACACAAAAAGAATTGGCTTATTTTGTCAGAGTTGCCACC
 CACACCTCTTCATGTTTCAGAAGACTCAAGTTCACCAGAAAGAACTTCACCACCAGATTCTTCAGTGATTGTCAC
 ACTTTTAGACCAAGCAGCTAAGAGTAATGATGATTTAGATGTGTCTGAATCAAAAGGTGTATGGAAGAAAAACC
 ACAGGAAGTACAAACTTCTAGGAATGTTGAAAGTATTGCTGAACAGATGGAATAATCCGGATTGGAAGAATTGTTGG
 TTCTAGTACTGGGGAGAAAAATGAAAGAACTTCAGTGGCTGGAACAGTGAGAAAAATGCTGGCCTAATAGAGTGGC
 AAAGGAGCAGATTAGTAGGCGGCTTGATGgtaagaaaggcagtcggaccattttgaaagtataaatgtcataaca
 gtatttccaaaaaattagctatttccggcaggttaatcgatagggtagctttatgtagtgtattctgttttagagaa
 actgtacagttcgtaatcagaaggtaaatcttctggtatcttaacatgatatggagaaggaggttttaattagt
 gctctgtatgttgtgtttctctaggggatggaaaaataagaatgggttatttagctggcagaaatgatgacagatt
 tgagtgcttactgtaggtcagctgctttacatatgttacctgatttttaactgaggttaggaactattactctct
 tcaggtgggaaaaactcaggaccatagagggttaataacctcatgcacagtaactactaagaagtggagaaccaga
 ttaaaatccagctctatttatgcttagagcctgcccccttaactactatgcggtgttgtctcagatgtagaacaca
 tctttgttttctctgaggacttagaaaaaacacgcgtgattcttctccactgaatataggaatagtttctaccc
 gtttagaacatgcatagtctttatcaataagtggttaactgacatgtgaaatcactttctactcttgggaagccga
 tgttttaagtcacagtagctgtatggtggaaattcctaacttatgttataaaaaaagaaaccactgtacacttag
 ctataacagctcttatataacttagaactttaagttcattccatttaccatacttggcgaaaaactgtacaaatttt
 agacaactgtattttgagtattccagtcatttgcgtgtaaatacatttttagttcagttgaataaacctttggccttt
 ttcatattaggcactgtggttaagttatggagacacagtgattaatgttgtgtataattataaatgtgagtgatac
 tcatttaacttttggatataggtgctgctgaagaacaaagtactttattattgttttgaacaaacacacacaaa
 aggtagattttttttttttttttttttttttttttttttgtgacggagctcactctgtcgcacaggctggagtgca
 gtggcagcatctcagctcactgcaacctctgcgtcccaggttcaagagattctcctgcctcagcctctcagtag
 ctgaaattacaggcatgcgccaccttgcctcggtgattcttgtatttttagtagagacgggggttccgcatgttg
 gtcaggctgggtctcaaaactcctgaccccatgatccatccacctcggcctcccaagtgctggaattacaggcgtg

ES 2 845 644 T3

agccacggcgccagcccccaggttagatttctacttggagatttagattacagaaggctttctaaggagcaaaat
atthaacaataagtagggatttaaaaagagcagacgtgttcacaggggaaactagaaaaagcatagagggatgct
tacggtttgcaaatcgtggcagaagtcagaaagttagaaaaattgctactgacttagatcacaggttgccttagcg
tatacaaaagtcctacctatgcactaagacttgcactgggaacttttcttgaatgtcatttttgacagatggtgcaaa
cggacaatctctcttggccaggaacagagtttaacctgggaacagtcatttttttaaatttatttttttgag
acggagttttgctcttgttgcaggctgaagtacaatggtgtgatctcggttcacggcaacctccgctcccg
gttcaagcgatttctcctgcctcactctccagagtagctgtagctgagaccacaggcgcatgcccctcatgctcagc
tattttttttttttttttttttttagttttttagtaaaacaaggctcttgccacattgcccaggctgataccaaactcc
tgggctcaagcagctctgccagccttggcctcccaagtgctgggattacagggtgaagccactgtgcccctgcctg
tgggtgcttgggaaactcatgagtagtactatgtgtctgttgaatagagggaataaagtgttttcacagtgatttg
tagtggactgtgaaattttagggattcaggctcagagttgtcacacaggtttagtcagggtgagaactgggtcat
gatgcagtatgaaaaagttcgagagccacttgggagagaacttgagataggccacctaccagtggtgtaaccagg
cttttgagaattcgtctgggatacgggtacaataaatactacatctattatgtgtgaagagatgtaagttaggga
calactgltgaalccaggaagagaaaccllclccalcaglllltagggalccclacclcllccacllaaaccccaaal
ggccaagctaggattgatttgggtgtgctgtagaagaacttcattgggtattcatggattcacattacatcttaga
ggagtttccaaaagcgtcttagactgtatgtgtatatacacacacattctgaagcagtaggtgggtcttggggcc
tgagatctcggtgaaatgtaaattttaggttcacagggtgatactgtagattcacagtgctacagagtacactatg
aatttgtggtgactacattatgacaaaaatatttaggtttataatcagaaaaagttaaaaatagttaatgaaga
tgctttaaaagcctgtgtactttagagaagctacttaacacaaaattgggtatctaagttaggctgggctgggatac
ttcatttttccaaaactctttttaaataaattgggtgaaataacctttattgaatatggttttctacatttttccaca
cttccctccttcataggggttggtaaaatttatttcatattcttagatgaggaaattgaggcacagaggtacaccta
caaagatacaataaattggcagaactaagatttgaaacccaggactaagtgattgcttatttatttaatttaatt
aatttttaagagacagggcctcactctgttgcctaggctggccttgaaactcctgggtcagcagctccactgct
ctcagcctcctgagtagctgggactgcaggcacaccatgcctccagttgtttttaaactaataagtagtcttt
cataaggacacttataataaaggcagagctggaacccacacttcattccagactgctcagactgagtttagtgta
gaaactgaaagtaacatttttattactgtatttcagGTAATCAGTATCTGTTTTTGCCACCAATCGTTACATT
TTCCATGGCGTGAGGTATATTCAGACTCTGAAGATGACGCTCTATCCTCTAGTTCTTGTCGAGTACAGTGAT
AGTGGGACATGCCAGAGTCCAAGTTTAGAAGAACCCATGGAGGATGAAAGTGAAATTGAAGAATTCACAAATGGC
TTAGAAGATGAGCCTGATGTTCCAGAGAGAGCTGGAGGAGCTGGATTGGGACTGATGGAGATGATCAAGAGGCA
ATTAATGAAGCTATATCTGTGAACAGGAAGTAACAGACATGAACATCCATCAAAACAAATCATAGTGTAATAAT
TGTGCAGGTACAGGAATTGTTCCACCAGCATTAGGAACCTTACATGTCAAAATGAATGTTTACTTGTGAACCTCG
ATAGAGCAAGGAAACAGAAAGGTGTAATATTTATAGGTTGGTAAAAATAGATGTTTTTCAATGGATAATTTTAA
CTTCATTATTTCTGTACTTGTACAACTCAACACTAACTTTTTTTTTTTTAAAAAAGGTTACTAAGTATCT
TCAATCAGCTGTTGGTCAAGACTAACTTTCTTTTAAAGGTTTCAATTTGTATGATAAATCATATGTGTATATATAA
TTTTTTTTTGTTTTGTCTAGTGAGTTTCAACATTTTAAAGTTTTTCAAAAAGCCATCGGAATGTAAATTAATGTA
AAGGGAACAGCTAATCTAGACCAAGAATGGTATTTTCACTTTCTTTGTAAACATTGAATGGTTTGAAGTACTCA
AAATCTGTTACGCTAACTTTTGATTCTTTAACACAATTATTTTAAACACTGGCATTTTCCAAAACCTGTGGCAG
CTAACTTTTTTAAATCTCAATGACATGCAGTGTGAGTAGAAGGAAGTCAACAATATGTGGGGAGAGCACTCGGT
TGTCTTTACTTTTAAAGTAATACCTTGGTGCTAAGAATTTCAAGGATTATGTATTTACGTTCAAATGAAGATGGC
TTTTGTACTTCTGTGGACATGTAGCAATGTCTATATTGGCTCATAAACTAACCTGAAAAACAAATAAATGCTT
TGGAAATGTTTCAGTTGCTTTAGAAACATTAGTGCTTGCCTGGATCCCTTAGTTTTGAAATATTTGCCATTGTT
GTTTAAATACCTATCACTGTGGTAGAGCTTGCAATTGATCTTTTCCACAAGTATTAACTGCCAAAATGTGAATAT
GCAAAGCCTTTCTGAATCTATAAATAGGTACTTCTACTGGGGAGAGTGTAATATTTTGGACTGCTGTTTTCCAT
TAATGAGGAGAGCAACAGGCCCCGATTATACAGTTCCAAAGTAATAAGATGTTAATTGTAATTCAGCCAGAAAAG
TACATGCTCTCCCATTTGGGAGGATTTGGTGTTAAATACCAAACCTGCTAGCCCTAGTATTATGGAGATGAACATGAT
GATGTAACTTGTAATAGCAGAATAGTTAATGAATGAAACTAGTTCTTATAATTTATCTTTATTTAAAGCTTAGC
CTGCCTTAAACTAGAGATCAACTTCTCAGCTGCAAAAGCTTCTAGTCTTTCAAGAGTTTATACATTTATGAAA
TTGCACAGTAAGCATTATTTTTCAGACCATTTTTGAACATCACTCCTAAATTAATAAAGTATTCCTCTGTTGCT
TTAGTATTTTATACATAAAAAGGGTTTGAATATAGCTGTTCTTTATGCATAAAACACCCAGCTAGGACCATT
CTGCCAGAGAAAAAATCGTATTGAATGGCCATTTCCTACTTATAAGATGTCTCAATCTGAATTTATTTGGCTA
CACTAAAGAAATGCAGTATATTTAGTTTTCATTGTCATGATGTTTGTGTGCTATAGATGATATTTTAAATGAAA
AGTTTGTTTTAAATTTATTTTACAGTGAAGACTGTTTTCAGCTCTTTTATATTTGTACATAGTCTTTTATGTAAT
TTACTGGCATATGTTTGTAGACTGTTTAAATGACTGGATATCTCCTTCAACTTTTGAATACAAAACAGGTGTT
TTTTACTTGTACACTGTTTAAAGCTATTAAATTTGTCATTTGACTTTTTTCTGTTAA

FIGURA 16

(SEQ ID NO: 72)

>gi| 227430308|ref|NM_001159589.1| Mus musculus sirtuin 1 (silent mating type information regulation 2, homolog) 1 (S. cerevisiae) (Sirt1), transcript variant 2, mRNA

gccagtgccgcgcgtcgagcggagcagaggagcgagggcgagggccagagaggcagttggaagatggcggacg
aggtggcgctcgcccttcaggccgcgcgctcccttcgcggcgccgcgcctggaggccgcgtcgagccggcg
acgagccgctccgcaagaggccccgcgagacgggctggcctcgggcgagcccgggcgagccgagcgagcag
tggcgcggcgccgcgggtgtgagggcgagcgccgcggcccgcgcgctgtggcgaggcgggcgagg
cggcggcgagcgcgaggcgaggccccgcgagggcgctggcggggacggagacaaatgggtccggcctcgggc
gggagccgagggcggtgacgacttcgacgacgagggcgaggaggagggagggcgggcgggcgagcgggcg
cggcagcgatcggtaccgaggtccatatacttttggtcagcaacatctcatgattggcaccgatcctcgaa
ttcttaagattttattaccagaaacaattcctccacctgagctggatgatgatgacgctgtggcagattgttatta
atatcctttcagaaccaccaagcggaaaaaagaaagatacaatacaattgaagatgctgtgaagtactgc
aggagtgtaaaaagataatagttctgactggagctgggtttctgtctcctgtgggattcctgactcagatcaa
gagacgggtatctatgctcgcttgcggtggacttcccagacctcccagacctcaagccatgtttgatattgagt
attttagaaaaagcccaagaccattcttcaagtttgcaaggaaatataatccggacagttccagccgtctctgt
gtcacaaattcatagctttgtcagataaggaagaaaactacttcgaaattatactcaaaatatagataccttgg
agcaggttgaggaatccaaaggatccttcagtgatcatggttcccttgcaacagcatcttgctgattgttaaat
acaaagttgatgtgaagctgttcgtggagacatttttaatcaggtagttcctcggtgccttaggtgccagctg
atgagccacttgccatcatgaagccagagattgtcttcttgggtgaaaacttaccagaacagtttcatagagcca
tgaagtatgacaaagatgaagttgacctcctcattgttatggatcttctctgaaagtgaaccagtagcactaa
ttccaagttctatacccatgaagtgcctcaaatattaataaataggaacctttgcctcatctacattttgatg
tagagctccttgagactgcgatgttataatgaagttgtgtcataggctaggtggtgaatgatgccaacttt
gttgtaacctgttaaagctttcagaaattactgaaaaacctccacgcccacaaaaggaaattgggttcatatcag
agttgcccacaacacctcttcataatttcggaagactcaagttcacctgaaagaactgtaccacaagactcttctg
tgattgtcacacttgtagaccaagcaacaacaacaatgttaatgatttagaagtatctgaatcaagttgtgtg
aagaaaaaccacaagaagtacagactagttaggaatgttgagaacattaatgtggaaaatccagatttttaaggctg
ttgggtccagtagtgcagacaaaaatgaaagaacttcagttgcagaaacagtgagaaaaatgctggcctaagac
ttgcaaggagcagattagtaagcggttgagggtaatcaatacctgtttgtaccaccaaatcgttacatatcc
acggtgctgaggtatactcagactctgaagatgacgtctgtcctctagttcctgtggcagtaacagtgacagt
gcacatgccagagtcgaagtttagaagaaccttggaagatgaaagtgaattgaagaattctacaatggccttg
aagatgatacggagagggccgaatgtgctggaggatctggatttggagctgatggaggggatcaagaggttgta
atgaagctatagctacaagacaggaattgacagatgtaaactatccatcagacaaatcataacactattgaagct
gtccggtaccaggaattgtctccaccagcattgggaactttagcatgtcaaaaaatgaatgtttacttgtgaactt
gaacaaggaaatctgaaagatgtattttatagactggaaaatagattgtcttcttgataaattctcaagttc
catcatcttctgtttgtacttgtacattcaacactgttggttgacttcatcttcttcaaggttcatattgtatga
tacattcgtatgtatgtataatttgttttttgccataatgagtttcaaccttttaaaagttttcaaaagccattgg
aatgtttaatgtaaagggacagcttatctagaccaaagaatggattttcacactttttgtttgtaacattgaat
agtttaaaagccctcaatttctgtctgtgaaacttttttttaggacagttaactttttaaacactggcatttt
ccaaaacttgtggcagctaaactttttaaaatcacagatgacttgtaatgtgaggagtcagcacccgtgtctggagc
actcaaaacttggtgctcagtggtgaagcgtacttactgcatcgttttgtacttgctgcagacgtggtaatgt
ccaaacaggccctgagactaatctgataaatgatttggaaatgtgttccagttgttctagaaacaatagtgcc
gtctatataggtcccttagtttgaatatttgccattgtttaataataacatatcactgtggttagagcctgcat
agatcttcaccacaaaactgcgaagatgtgaatgtgcaagcctttctgaatcataataatgggtacttctactgg
ggagagtgtaatattttgactgtgtttttccattaatgaggaaagcaataggcctcttaattaaagtcocaaa
gtcataagataaaattgtagctcaaccagaaagtacactgttgctgttgaggatttgggtgtatgtatcccaagg
tgttagccttgtattatggagatgaatacagatccaatagtcaaatgaaactagttcttagttattttaaagctt
agcttgccctaaaactagggatcaattttctcaactgcagaaaacttttagcctttcaaacagttcacacctcaga
aagtcagttattttttacagactcttttggacattgcccccaattttaaattatcatgtgggttagtatttta
ttacaaaaaaatgatttgaatatagctgttctttatgcataaaaatcccagttaggaccattactgccagagga
gaaagttattagtagctcatttccctacctaagataactgaatttatttggctacactaaagaatgcagtat
atttagttttccatttgcatgatgtgtttgtgctatagacaatattttaaattgaaaaatttgttttaattatt
tttacagtggaagactgttttcagctctttttatattgtacatagacttttatgtaactctggcatatgtttttag

ES 2 845 644 T3

accgtttaatgactggattatcttctccaacttttgaaatacaaaaacagtggtttatacttgatatcttgttt
aaagtcttatattaaaattgtcatttgactttttcccggttaaaaaaaaaaaaaaa

(SEQ ID NO: 73)

[illegible]

cctaaagatttattattatatctaagtaactgttagctatattcagacgcaccagaagaggacgtccaatctctt
tatgggtagttgtgagctccatgtggttgctgggatttgaactcaggacctttggaagtgtaatgtactcttaa
ccgctgagcccccctgcccctccttcatctttacctttgtaagattgttagagacttggcttagaaccagtcatactg
tgttgtgtgtatgttaggcattatgttagcaaccagagcagtttgaacagagtgaaaagtatgaatgaatcaga
atctcagttgtgggagggcagaggtgagcattgccaagcaggtcgggtgtgtgctggccctcagccccagac
gagggctaggggtgtctcaggtgtgatttagactaggggttcgcccctcttatttttatttttattttatttttt
ttatttttagggacaacatttaagttttgtgtttgggtgctgcatgtggtggtttgtgagctatagcactgtgg
gagtcagtacaacctgagttgtgagttgctgtccttctcactgtcagtccttggctccaggcttcacagaagc
accttaactggctgagctattctgtaggccccagttttagttattcttgaaacgggcttactcacagccctgga
tggcctggaacttggcagagatcctcccactattgggattatttcaggtatgtactaccatgcctggcttatt
tttttgagacgggtctctatagtttaggatggtttcaaacttgcagcagtccttctgtttcagaaaaattgggat
taggagtatatagcaggagacaactctgtttgtttgttccaagttgaatggatctgtaaaactggaatggaagaa
agcttgtccattccccctatcgggaggtgtcaagatttatctacagaaaacgggtattgtcttaatttttggagac
aggattatactatgtagctctggctggcctagaaacttctttgtagaccaggctggcctcaaacttgttagagatc
cagtcctattctggctcccaaatgcaaagattaaaggccagtgccatcatacctgggtatttaaaaaattttgtg
tagccatgtgttagtaacacatgcttttaattctagcacttgggaggcagagactgggaatctgtgagttggag
ccagcctggctctacagagcaagttccaggacagccagggtctacagagaaagcctgtcttgaaaacctcccaatt
ttttgttttctgtgtggtgtgtatgtgggtatgcacgcacatgagtggtgtcagaggacaacttgcaagtat
tactatgggtcatccagtaacggtagccttttagctgtgagacatctcactggccctttgttgaattttatttt
tactgtcttagcctggacagacactctacagttgacctatccttagcccttttttaggttcttaggggtggtac
ctgaacttaaaagatcctgctcagctatcttagctctgactataaaacttgtgccaactgtcctgggttttatoat
tataattttataattaaatgcatactcttagctggctatgggtgatgcattttctgttatcccagcatttgcctttc
agggccttagtgactgttaactcagcatttaggatgtagacacagggcagatccctggagcccaatggctaccagc
ctaactaaagacactatctcaatgagaatcgaggtggcccatgccactagttcttagaggcaggtaggtgtgtgtg
tgtgtttgtgtttgtgtttgtgtgtttgtagttagacatgtcaaacaaaagacaaaaattaaagctattaataag
taagtaaatgttacttcttgggctagagagatgacttagaatttaagaggtcttactataaggccaggggccca
gattcagttccagtagcccataggcaattcacaaactgcacatgattgtatgcattctgacctccggtggacacaggc
acctgtgtagaacacatacatgtaggcttccctatgttccatataaaaaataaaagcctaattggcttctgaaaa
aaaaaaaaaccacaaacccaaacaaacttctgtgtgatgtgtgaagtagttctaaactcctggacaacataaac
aaagatcccaaaccttttttgagaatgattttgtctgtgtgattgtcccaggtagtccttggaatcagagccc
aaacagccccctcagttctccctgagtaactcgagactttaaagcatgaaccagtgctcagtcataaactagctatt
gaataaagtttcaaaacttgagtattcttgaggtagtaagctgcctatgtgaggtcagtttggaatgattggta
aaaagttgtacctactttttgggttaaaaaatgaaattgagctgggtgtggtggcgcacacctttaatcccagcac
tcgggagggcaggggagggcaggtatttctgagttcgaggccagcctggtctacaaagtgaagaaagtgatttctagga
caggcagggctataaagagaaacctgtctcgaaaaaccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
ttgtatttgttttaatttgttttaaatgctcaaaagggttaagattagccattaaagcagtatgtgagcagatttaa
ttatacttattttacgtattttacctgtatttgaaattagaaagcttgtggtgtttctgttcaaaactttgattttt
catctctcccactaaattgtatgtagtaaaaggtacttactgtgaaggtagacagttaatggggtgacttaggtc
ttgtctgtttcagGTTTCTGTCTCCTGTGGGATTCCTGACTTCAGATCAAGAGACGGTATCTATGCTCGCCTTGC
GGTGGACTTCCAGACCTCCAGACCTCAAGCCATGTTTGAATTTGAGTATTTTAGAAAAAGACCCAGACCATTT
CTTCAAGTTTGCAAGGtatcacacgtttttgtctttatgataaagagttctcactgttaggcttttaagttta
cattcatctcccagtgatttggaggtaccaggtgtggttagttagaacttaagttgttttaggactgttttaata
atgtaattttgggtcttttgctgtgtgtcttgccctctcctttggaagttttagatctgaaaaaaaagaaag
actgttttcaactactcttttttctgaaatcaaaaggttctatgactactatgtggtatgttttataatgga
caggcttaatatatgcataatgtctaaaaatgatttttaataactcaagggttgagattacatgttttgggaaacat
tacaaggggagctctttctagtgtataagtcagtcaccacatgtgactgcatgtggctattgaatgtgtgtaatg
acacagtgagggtcatgcttacttaaggatttttaataactttgtctaaagaaaagtgaaatataactaattgtactta
ttaataactaacaagcaaacatttttatgtttgggactatgttcaggagccaggcataataatacaagtcctgca
gtccgggtatttccaggggacaggaacttcatgaactgccaggggagggtacatcatgagactcagcttcaaaa
acaaagcagtagcaattttttataggcattttgaaaatttcaactttcatgtgaactaaagaaattgaacacttgg
ctcctatgtctgtgtgcagctctgctctgtctgtagaataaaagtttatataaattgtctcaagatttttagtca
ctagaaactttgcaaggttttatttgttttgtttctttgtttttttgtttttttttccagtttaactcttaaggt
tttttgttttgaggcagctctgagtagggcaggccgggtcttgaattttgtcttagccatggcttttgaatttccctg
agcctcctgctctaaactcccatctgttgggatttagagcaggagctgctatgcctggctgttatgttcaactgtta
gggaacttggaatacatatgcaaggcttttctgatttagagagatgttttagagacgtctttaaaagtttcatc
tgtggaggggtggagtggtgaatgggtgttgaccccaagtgacccgggtggatgtgacagcactaccttagttta
gggggttgggttccccacatcacacgagagttcctggattagaactcaggtcagcagattaggcaacagctta
tctcccaatccacctcccatcttgaagccctaagggtggattagaaggctgtcttccctcagtcacagctctcaga
actgtaaggggtgcttttagttctgtctccgtatcctggtgctgggattagaggtagggcagactttgcagctaa
gtgtactatttggaagctgtgctgtctacactgtttaaagaataaccagtcacaaagattgttttaatggatgcaggacc
ctgggtgatcatgtgtgtctactataagtagacacagatttaggaaggccagcaagtaaaagttactttcatctta
tacaagcatagctggttagtgattatgttagtattccacacacttttcttataaattctatgtttgtgagttgg
ggaaactgcattgtcataactagtcttttttttttccccccagctattttaccgggattgtcaagtgacagatac
atatctaaaaattgaaagttccacatgttctttaaattacatttagttattttattgcttatgttaggtgtatgggca

agcatcattttgttccctcttttaggggattataaggactagaattccagtaaaacttagctctccaataatgcgttaa
 caagctaaccctttttatgtccctaataccagggttttaggaggtggaggcagaagggtctcaagagtttaagggcagt
 ctctgttaaacactttgagttccagggtctcctgggttacagagtgaaatagcacacagtggttagaccatttttag
 cacaaggccccagattttgtaccacaaagaatacacatgctaaagtatgttttttccctaaatttttaattgtgtt
 ttagggcagatttaaaggcataaaaaatttagtttattaaaaaaagatagatgggataattaaagtgcacttagtt
 tgtggatgataattctatatgttagaccctaaaagcctcaccagagaactccccctttttatgtaccacctaacaaa
 catgggcaggaggagaaatctggaaaaagtcttcatagtcatctcagacaaacagaggctggagaggcgagccagt
 gttatgtgtgcatgtcgtcgtgtgacacctttcagagggtcagtttccagcatctgtatccagaggctctacagctg
 cagttatccccaggccaggttagtgcacgtgctgctggccttcaggcctccacttcattggcaccctgcactcacc
 acatcctctaccccagacatgcagataattaaaaagtggttaaaatgggggcccgttgagagcagcacttgttcttgc
 acagaggatcagagtttgggtccctaccactcacatgggtggtcataaccatccattactccacttctctccaact
 cccctttctgtcatccttgggcaccaagcaagcatgtggtacatatataattaccttcagggcaaaagcactcattta
 tataaaattacttcttaataataaaaaaccaagggttaggtatggttagtgcaggtctttaatctcagtcctttgga
 gtttagaggcaggtggaccatctagggtacataataagaccctacctttaattcagttttatccatatgaactat
 gtataacatgaagtatgtgtaatgctctgcattatcatatgtgtgtgagttttgcatgttcatgttcaagttcag
 taagaatttagtctcatagcttccctagttgaaattcttttatttgggttagtcggtttggcatacatcactcaaaa
 ttatttctgaaatgtgatgaaatattgtataattctccatgagtgatgacctaaggattactttaagtggacag
 ataagtgcattttttatggtatacatttatattgtatttataggtggctatatcggttaacatccattactttaca
 taggtatttctactcttacctcaagacattgtagatacacaatgttagtaattgttaatctcagtcctaaattgt
 ttctccctcagagattatgtgtcgtcactagcttcttcccaatcttactctaccatattagctgagaaattaat
 tgttaataaactgggagctgtcacaggaccactgttttacatttactatctgtccttgagtcagttttatgaccg
 ccacgtctatttacagatcatctttgacttcttttctatatagaccatatggcaaatgtatagcccataaagc
 ctaaaatattccctgttgtgaccctgtacagaaaatattgttctgtttaaatttaaataaccttcaagaggtagctg
 tcaagaaattgagtgaggtttaatgaataagtaggaggagggttcttagtggaattttgtttcacattgcatgtg
 tgtgtgtgtatgacagtggtcagtgtagatctctgttttaggcagctctgtatgtagccaggtctctcgccatct
 ctgtggacaggggatccctgctagactgttcagctggagtccttgtttctgcctcctgcattcagagtttagagca
 ctgggctccaactgacagtgtaaatacttcccactgctcagtttctctaccccttcacattttttgtgctgt
 tgggattaaactctgtgctcccatgccaccagccttctagtgtttatagaatgaaatgtagggtataacccaaa
 caaactcaactgttttctcaggttctacaactctaaagattaggtgaattttgctctaccccgagtgctgggat
 taaaggtgtatgcccacactacgcaggtctattatcttttaacaaaaaatttaaacctttgatctcagcaga
 alaccaacatagttgggtttcttaaaagccttttaggalgttttagacttgagatgggtgacctatctttttgatt
 ggaataaattaaacccatgccctataaaaaaactccaagctatttgagttacagcagaatttttagattcagctctat
 ataaggcaaaattttcattaaaagtttttagaatttttagaattttatagaatatttccagctgtttcttaattggg
 attccaggcatgtgcccactcagttccagcttcatgagtgctttctgaaatgcactgtaattggagagcaaaattaaag
 acaggaccatccatatgtatatacacataacttcagtttttgccttaatacaaccagaaagattacacccctggtga
 ctacttgcctttgttcatgtgtgtcatgtctattttttaggtcagtagatgagagccctctcattctctcagtggtg
 ctgaatatccactgtatgggtgtaccttgcacaaactagtttccgtattgtatggacatacatatggtttgtgttta
 gtttttgcctaacattataatgggttagataaaagcctataatgttaaggaaacagatagtgtaagctacttgaaaga
 aaaaagaaacttccctggcacagtcactcactaaatgaaatgaaataagaacactatcaggagttgtgaggatga
 ggggctgaagagatgggtcagcacttaagagcactgggtgctcttccaaaggccctgggttcagttcccagacc
 cacatggcatgtggatctgacaccctcacacagacatacatgcaggcaaaatatcaatgcacatataaattagta
 aattaaataatgtatataatttaaaagttgggaggaccaaaattgatacttttctctgactcttttggcactgtg
 tatatctgaattctttgttttaagaagaacagcattgaagcattatttggggggaaaaacacacacacaaaa
 tccagcaactcaacattcatgagcagctctgttctataccagtagtgcctgtgcagtggaaggaaagcaatttt
 ggtaagggaattaaaaacttcagcttttaaaactcccagcaggttgatatttatcaatgatgaatcaaacagaaagt
 taaataattcattgacagccttttttttagttgttaaagtcaccatacctttaatatctgtaatttccagtgtaaag
 ttttccccctttttccttaaaagaaaaactatgaatttgcagccaacaaagttagatgtatcctaaggatgtat
 ttctcttgacattaagtagtccattacgatgtgttatcttgcacttcaagggaaccaagtttactaattgtcaggt
 tttcataaaagttaacaagcctttttctaggggccatccatttagatgctttaaattgttcatgtatttttggtatta
 cagaatattttatgttagtacctgtttgactaaacataagcaggatctgtttagcttctttcatttaattaaac
 ttttctgccttttgcattacatagGAAATATATCCCGGACAGTCCAGCCGTCTCTGTGTCACAAATTCATAGCT
 TTGTCAGATAAGGAAGGAAACTACTTCGAAATTATACTCAAAATATAGATACCTTGGAGCAGGTTGCAGGAATC
 CAAAGGATCCTTCAGTGTCTAGTGTGgttagtgacgtcacagtggtctcgttagggcggttcaataggtaaccggcgttg
 gaaagaagctgctgtctagtgacgagactaagcgttatttagtaaccttgagtggaacaaattgaaaaggacaca
 acaaaagctgaaggcctcagatgtggtgggtatactttgataacaagttcaaggctagccttgactaaacaagac
 acaggaactgaagtaactcagcttgaaccttccagctgcagttttggcacttgacaggttatgttattgtcaaa
 tagtgactttagaagataaaggtctatatacacatgtatttagtagataaaactatcacatgtatttatctctta
 aatacgtcacaggagaggttcaggttagtcttcatgggtgggctagagagatggctctgcatttaagagcattaaag
 agcactgactgctcttccagaggtcctgtgttcaatcccagcaaccacatgggtgggtcacacactatctgtaatg
 aatgcctctcttggcatgtagcagtgaggcagatacagcatcctacataaaaactgtaaaagcttctcatgga
 gcaagccacaaatagcccttcaataaaatgttctatatttgggtgctggagagatggctcagtggttaagagcacaac
 tgctcttccaaaggtcctgagttcaaatcccagcaaccacatgggtggctcacacacatctgtaatgagatctgac
 gctcctctggtacatctgaaatctgaagacagctacagtgacttagatataataataaataaataattaaaaaaa
 aaaataaatgttctatatttgggtgttttagGTTCTTTGCAACAGCATCTTGCTTGATTGTAAATACAAAGTTG

ES 2 845 644 T3

ATTGTGAAGCTGTTTCGTGGAGACATTTTTAATCAGGtaatttaattcatctcatTTTTaggaattgtgtaaacttc
acttttgggtgtatcttcatccccccccccccccctctgagaagcatgagtggttagaaatcctgatgtaaaca
ggtcttttttgcgaagagcatgttagagcacacttgaaggctgaggcagggcactgtaagagtcaggctaacctga
gctggatagcaagagtcctcatTTTTtaaaaaaaagtTTTTctgtgtcagttggttagatcatggctgcttagc
atTTgtagctctggattgctctcctgctgaaatcctaccatttaaggagggtggagaataagaagttgaaggt
catggtcacctacaaactcttctcaaaccaaccaacctaaagtccctccttaatacacctaagcacctccttata
taacttaggcctaagtcacaagttgcagggaacacctctggaatttagctttacattagttgtgtggaagatttaaa
aaccttttcaaatgataatgaagtattttattacaggaaaatatagcaacacacatccagatatattgttttaact
ttgaactcatgtataaccaggaaaaaaaagacagtataactcaaatggagtcattttcataaatatttttaaaag
gtcttgttttcatctttaccacgctctttgcatatttatagtatcttgtgggtgcacagtcgctatggggaaat
gatagcatgtgtggagactggataagagagatcaggctgtggagggtcagaagatcaacctgggagtcagttctca
atTTctacctgggagttaaatttgggtgtccggtcttggtgaaaagtgtccctgctggttaggtcacccaccccca
ggctccacactggctccacagcagacactatcaaatccacagcgtttgtttgtgtggaatgtgcccagtgctaa
cctgggctacttgactttcatgttttgtgcagGTAGTTCCTCGGTGCCCTAGGTGCCAGCTGATGAGCCACTTG
CCATCATGAAGCCAGAGATTGCTCTCTTTGGTGAAAACTTACCAGAACAGTTTCATAGAGCCATGAAGTATGACA
AAGATGAAGTTGACCTCCTCATGTTATTGGATCTTCTCTGAAAGTGAGACCAGTAGCACTAATTCCAAGtaagt
tgatgttttagggacagttgtgcatgctgtgagttgtggatctgtgtaagatgtgattttactcttttcatTTtag
aaaatagttgaaggtctaagtttacttttttagtgatactcataaagtgcattttgggtatggggaatgggactg
tgaagacagaatcagattttaattgtagttcatataaaatcaaagcaaaactgTTgacgcatgcttttttagt
agtggtgcataTTaaagttgcagaggtcagctttaatttaattccagggaatagtcctctctttttatttttagtgtg
ggggtgtttgctgcatgtctgcctactttggccagacaagaatgtttaagagtgctctcccaaggggctggtgag
atggcttagcagtttaagagcactgattgtctctccaaaataacacttttaaaaaaaaagtgtcgccccctcccc
caaacagtagtTTctcaaccttctaagtgtagtcctcttttgtacaattcatgtttaaacctccaatgataaaa
aatTTgttactttaacctataaatttttgtagttataaatacacaatgtaaatatctattttctgatggtcttaggc
aagccctgtgaagggtcattcactcccaaggagttgttaaccacaggtcgtgtgacccactgctctagaatatg
tacagtattagtatccccctcattgctattttatgtgcttatgtatgaagaagtggtgtgtgtggtgtgtgttc
cagagatggactgatcagtagtgaagaagcgtattctttagtgaggaccaggaactcacacccaatttttgcagtt
tataggggactcgtgctttgttttgccaaagtacttacattgtacacttacatggatgtaggcacataacccgctc
ccccctcccccaacacactccattcttgaacagatctcactataacttggcacctgggatacctatgtagact
aggctagccccacattccagtcctcctgagtgatggatgggacaaagctgttcccagctaactctttggtagccag
gagttgtagtatttggtagcgggtgctgtgaaccatgtggtatagggcaggaagagtcaggagttctactca
gcagatttgaagccagcctaggatagatgaaaaaatgagttctattccataatagttgtagttccacaagaata
tttacttatgtctaggagttcagcctatgggccaacataatcccaagggtaaaatttttgaattgaaccactc
ctccatgtccaagtTTctgtcattcttgatgtcctcaaagatccaccgcctctcccccaagtgttaaaggcca
tgagccttcaacaccagctagacttttatttttttaagctaatttaaaagattagtttaagctttctgaactgga
acacctaggatctcagctaagtcctgaacagaagtgccatgagtttaaggcctgagcgggaggaaggtctactgt
ttgttatgtagagggaagttgctttttgaaaatgtgattttgtatttctgcttgccccctcttttgttgttgggatta
gcgggggtgtgtcactacatgcccacctcttgacagttgtttaaaatlaacttctcttttctaactccccctttcacc
ccatTTTTlagGTTCTATACCCCATGAAGTGCCCTCAAATATTAATAAATAGGGAACCTTTGCCTCATCTACATTTT
GATGTAGAGCTCCTTGGAGACTGCGATGTTATAATTAATGAGTGTGTGCATAGGCTAGGTGGTGAATATGCCAAA
CTTTGTTGTAACCCCTGTAAGCTTTTCAGAAATTAAGTGAAGAACCTCCACGCCACAAAAGGAATTGGTTTCATTTA
TCAGAGTTGCCACCAACACCTCTTCATATTTCGGAAGACTCAAGTTCACCTGAAAGAACTGTACCACAAGACTCT
TCTGTGATTGCTACACTTGTAGACCAAGCAACAACAACATGTTAATGATTTAGAAGTATCTGAATCAAGTTGT
GTGGAAGAAAACCAAGAAGTACAGACTAGTAGGAATGTTGAGAACATTAATGTGGAATAATCCAGATTTTAAG
GCTGTTGGTTCCAGTACTGCAGACAAAAATGAAGAAGTTCAGTTGCAGAAACAGTGAGAAAATGCTGGCCTAAT
AGACTTGCAAAGGAGCAGATTAGTAAGCGGCTTGAGGGtatggaatgcggttttgttgaaatcactttcaagtaact
gtgatcagaggagggtgattcccaatgtcagataaactgttttgacattagttgatgaaggtagtgctatgtgttt
gtgtgtattaagttaaagtaagtttgggcatgagtttgccttctgtggcagtagtggtatgattaaacctggg
gcttcaagcagctagggaacgagatctgtcagctgagttatatcccaaaagtgggttttactccgttctccacc
tccccagcaaatgattlaagacttgggtcagtttatgatctttagggltgggaacctgttclgggtlgggaaaact
cagggttgaagatgtaccccagaaggtaatttaggcctagggtctgccttaaggctgtaccctcttctacctctctg
ctcaacaaggtgcctgttttaagatctcgaaaacagggttccatctactggacacctattttgtcctgtcaa
ctggttaggggtggtgcaaacactgctccccctccccctcaacacagggcacaatctgttcaacacaattgggaggtctg
tgctctgggaattgcaacttggcctgtatcatatttgcctctggaacaagctttggaagtatgtttctggtcattg
gtgcaacaaggagctgttagacttgaaaagatgtaatcccagccttcaggaggcagaagtaagagttgagttc
aagagtaagccaacaagtttaggtactaagggacacataaaattctaaagtgtattttctctgtattttcagGTAA
TCAATACCTGTTTGTACCACCAATCGTTACATATTCCACGGTGTGAGGTATACCTAGAGTCTGAAGATGACGT
CTTGCTCTTAGTTCTGTGGCAGTAACAGTGACAGTGGCACATGCCAGAGTCCAAGTTTAGAAGAACCCCTTGGA
AGATGAAAGTGAAATTGAAGAATTCTACAATGGCTTGGAAGATGATACGGAGAGGGCCGAATGTGCTGGAGGATC
TGGATTGAGAGCTGATGGAGGGGATCAAGAGTTGTTAATGAAGCTATAGCTACAAGACAGGAATTGACAGATGT
AAACTATCCATCAGACAAATCATACACTATTGAAGCTGTCCGGATTGAGGAATTGCTCCACCAGCATGGGAAC
TTTAGCATGTCAAAAATGAATGTTTACTTGTGAAGTTGAACAAGGAAATCTGAAAGATGTATTATTTATAGACT
GGAAAATAGATTGTCTTCTTGATAAATTTCTAAAGTTCCATCATTTCTGTTTGTACTTGTACATTCAACACTGTT
GTTTGACTTTCATCTTCCTTTCAAGGTTCAATTGTATGATACATTTCGTATGTATGTATAATTTGTTTTTTGCCCTA

ATGAGTTTCAACCTTTTAAAGTTTTCAAAAGCCATTGGAAATGTTAATGTAAAGGGAACAGCTTATCTAGACCAA
GAATGGTATTTTCAACTTTTGTGTTGTAACATTGAATAGTTTAAAGCCCTCAATTTCTGTTCTGCTGAACCTTT
ATTTTATAGGACAGTTAACTTTTAAACACTGGCATTTTCCAAAACCTTGTGGCAGCTAACTTTTAAATCACAGA
TGACTTGTAAATGTGAGGAGTCAGCACCGTGTCTGGAGCACTCAAACCTTGGTGCTCAGTGTGTGAAGCGTACTTA
CTGCATCGTTTTTGTACTTGTCTGCAGACGTGGTAATGTCCAAAACAGGCCCTGAGACTAATCTGATAAATGATTT
GGAAATGTGTTTCAGTTGTTCTAGAAACAATAGTGCCTGTCTATATAGGTCCCTTAGTTTGAATATTTGCCATT
GTTTAAATTAATACCTATACATGTGGTAGAGCCTGCATAGATCTTACCACAAATACAGCCAGATGTGAATATG
CAAAGCCTTTCTGAATCTAATAATGGTACTTCTACTGGGAGAGTGTAATATTTTGGACTGCTGTTTTCCATTA
ATGAGGAAAGCAATAGGCCCTTTAATTAAAGTCCCAAAGTCATAAGATAAATGTAGCTCAACCAGAAAGTACAC
TGTTGCCTGTTGAGGATTTGGTGTAAATGTATCCCAAGGTGTAGCCTTGTATTATGGAGATGAATACAGATCCAA
TAGTCAAAATGAACCTAGTTCTTAGTTATTTAAAGCTTAGCTTGCCTTAAACCTAGGCATCAATTTCTCAACTG
CAGAAATTTTTAGCCTTTCAAACAGTTCACACCTCAGAAAGTCAGTATTTATTTTACAGACTCTTTTGGAAACATT
GCCCCCAAATTTAAATATTCATGTGGGTTTAGTATTTTATACAAAAAATGATTTGAAATATAGCTGTTCTTTAT
GCATAAAATACCCAGTTAGGACCATTTAGTCCAGAGGAGAAAGTATTAAAGTAGCTCATTTCCCTACCTAAAGA
TAACTGAATTTATTTGGCTACACTAAAGAATGCAGTATATTTAGTTTCCATTGTCATGATGTGTTTGTGCTATA
GCAATATTTTTAAATGAAAAATTTGTTTTAAATTTATTTTACAGTGAAGACTGTTTTACAGTCTTTTTTATATTG
TACATAGACTTTTATGTAATCTGGCATATGTTTTGTAGACCGTTAATGACTGGATTATCTTCTCCAACCTTTTG
AAATACAAAAACAGTGTTTTATACTTGTATCTTGTTTTAAAGTCTTATATTAAATTTGTCATTGACTTTTTTTC
CGTT

FIGURA 17

Secuencia natural antisentido (CV396200 – expandido): SEQ ID NO: 3

CTTTTCActTGTGAATAcCAATTAGGTTtCcAGTTTtCcATAAAGATCTAACAAATACCCAATTTCTCCATCAGA
CtGACATCCCTTAACAAAAGCAGAGTTTCAATTCCCTGCATCTCCCTTAGGAGCTATGATATAATGTAGGTAGAA
ATCTTGCCTTAACTCCATTTACCCACTGTGCTATAAATAAGCAGAAGCAAATATTTTTtTAAGGCTGGAGAGGTT
TTAAAAATCTGAACTAATTTAGCAACTGTGCTGCACCTCAGTTTTTGGCAGTTCCCAACATCCATTTATCATGTA
AGGATAAATCCTTCTAAACCAGAAAAATGTTTCCACTTGGAAAAGGCATAAGAAAAATACATATACGACCTCCCC
ATGTACTAGTCTTACATACCCAGCTCCAGTTAGAACTATAATTTTTTGCACTCTTGCACTAATTTTACAGCAT
CTTCAATTGTATTAATATCTTTTCTTTTTTCTTTTTTGGTGGTCTGAAAGGATATTAATAACAATCTGCCACA
GTGTATATCATCCAACCTCAGGTGGAGGtATTGTTTCCGGCAATAAATCTTTAAGAATTGTTTCGAGGATCTGTGC
CAATCATAAGATGTTGCTGAACAAAGTATATGGACCTACAATAAGGGGGAAGGCTTAAAGTCAACTTATCAA
GTAATTCAAAATCTCATTTTATTTTCTGAAGTaATGAGTTAGCATTTCTGTGAGGGTTTTTTGCAAGTAAGAAAAAT
GCAATTTAATGGTATTTTCTTCTCGGTACACTCAGAATTAATGCTATATCCCAATGAGATTAGGAAGATCTAATG
AAGAGTTGGGAAGACCCCTTCAGCTGTAAGTATATATTTCAAGAGTCTAATTAATTAACAACCAAGAAATTAAGTT
CTTATGGTTAATATCTAGAAACACACACCATAAATACCAAAAGTATTTACAAAAGGGTCTACGACATAGAAAAAT
CGTACCAGTCTTAAAGCCTGTACTACTTTATCATTAACCACACAGGAAAA

Secuencia antisentido (CV428275): SEQ ID NO: 4

cgacgAnAACATAAGCACTTTTAAATTTCCCTCTcTATTATGCTACAGACAAGGCcGAAGACTGGGTTTTTTAggTT
GTTtAAGGCTGTAAAGAAAACAAAGAACATATGACAGAGACCCATGCAGTCTGCAAGCATACTACATATTTAC
TACCAGGCCCTACCTTACTACAGAAAGTTTGCTGATCCAGCTGTGAACATATACCCGATGCAGATGAAAACAAA
TACAAAACAAACCTTAACCTTGCCATTTGGTCACAAGAGCAAGTAAGTAGCAGAGCCCTGTTTTGATATGAAATC
CAGCACTGGACTGGGCAACATGGCGAGACCCATCTCTACCAAAAAATACTAAAAAAATAGCCGGGCATGTTGngG
CACATCTGTagtactagctacttgnaggctgagacaggagaatcatttgagcc

Secuencia natural antisentido (BE717453): SEQ ID NO: 5

cCTGTATAtACACACACTATGCAATAGTCTTAGGTAACtAATTAGCTGCAACCCtAAGGTAGATCAAAATAGAAAA
TGTCAGTTCGCCACAATCACATCATCTTAATTAATATGGAGGGAAGGTAGGAATCTGTTACTCTTCCCAACACTA
AGCTTT

Secuencia antisentido (AV718812): SEQ ID NO: 6

TCTCACTGTCTCCAGGCTGGAGCGCAATGGTGCAATCTTGGCTCGCTGCAACCTCCAACCTCCAGGTTCAAGTG
ATTCTCGTGCCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCGCCTGCCACCATGCCCGGCTAATTTTAGTATTTT
TAGTAGAGTTGGGATTTACCATGTTGGCCAAGCTGTTCTCGAACTCTTGGCTTCATGGGATCTGCCCGCCTCGG

CTTCCCAAAGTGCTAGGATTACAGGCGTGAGCCACTGCACTCAGCCAGAAAAGATTATTTAAAAATAATTGAATGC
ATGCAACTGCAGCATCTTTTGAAATCAAAAGCAAATTAATATCTGAGGTTTTCTATAATTAAGTGTCAAGGCCAA
TACTTCTGgTTTTATTATTTTGGTTTTCTACTTTTCTGAGGTTATCGATAAATGgagaAACATGATTAAATaAAT
GCTTTATCTnCACTTCTCGATGGCAGTCAGCTTTAatggaAAATATtTTCCTATAAAcCTAAAttaatttccgga
aacccttttgaggttaactaccattgcaactggaataatctttggnatccccggaaccctgttcaaggg

Secuencia antisentido (AW169958): SEQ ID NO: 7

GGCACTTCATGGGGTATGGAACCTAAAATAGGGTGAAAAATAAGAGTTAGAAAAAGGAGGAGGAAGTAAGCTAA
TAAAACCACAACAGATACATTTATGCAAAAATCCAACAAGGGCTTGAGCTCCAAATTTCCCAAAAAAGACCCATGCA
CTAAATACTTAACCAAGCCATTACATTTTCATCAAGCAAGCAGATGGGCAGTTAAGTGCTCTTTTATAAAACGCTCA
AGTTCTGCTCCTATCACCTGGTTACCCCTGAGCAATCTTCCAGACTTTCCCACTCTGAACCTCAAATTTTCCTTG
CTGCAGAAATGGGGATGATAATAGTACTTCTCCACAAGACTGTGGTGAGGATTAAATGAGTTAGTCAAGTGCA

Secuencia natural antisentido de ratón (AK044604): SEQ ID NO: 8

gggctccccctcagcgccctctggcgccctcccgcccgcccgaccggttcgctcgctcgctcgctcgctcgctcgctcgct
cgctccgggatcgccggttggttcaagtttgcgatggcgccgaccttcccacctgggacctcagcgctgcacctt
gcctgcctgcgccctcttcgctcaagtcggtttttacctcaggggctctggagagcccaacctggccgacgccgg
ccttctctgagagaaactcctccacctgacctgaccttgctctgtgacagctcttctcaggttacctctgtggtc
tctctcaggaagtttgcgctctctcccaatctcccttctcaagtgcattggaatgcccagccagccctcgggg
cctgttgccctcctggaaagatctggcgattgaggaccgcccctatctgctctctggacccaccaggtcctctgt
acctcgcttttagtcttttggtaaaaattcatctcttggggagcaagagagaggacagaaagggagagtggttggttc
tccacaaacttctgtgttaagagtcagattgggacctgggctctgtgacttgggcgattgactgaaccttttcta
agcccagtttttaattcatctctaaaaatgacagggccaggaccgaaagagactgtagctcagttgtaaagtcacgc
ttgcccagacaaccccgaaagccctagagagagggaggaaggagggtaagttgaaggttaattctccaactacttagga
agttcaaaaaaggccctggaatacataagacctcgctcctcaaaaacgaaatttaaaacgatatagaccatgagaaatca
gctagtcaggttttaagtaaatgacatttagtttttaaaatcctaggcagttgatgggtggcacaggcccttaattccc
agcaagctggaggagacagaggagggttcaactaggacagccaaaggctacacaaagaaacccgtgtctgaaaaaat
aatcttacttctagaattgtagaaatggctctgtagttaacagcaactgttgctcctgcagaggccctaggtttg
actcccacatcatccacatgacagctcataccttcagatctgacacctgctttttggtaaacacagacatgtatggag
ccaaaagacccaaacacataaaaatcctctttgtgtgtttttatgagttagggtttctctgtgtagccctggct
gtccaggaactctgtagatcaggctgtccttgaactcagaggccacctgcctctgcttcttgaaactgctgggatt
aaagatgtacaccagcaagccagcataaaaaatcacatatTTAAATAATTTTTAAATAATCCTTAGTTCCTTCAC
AACTCTAAGCCCTTCACTTTCTAGTTACCATGAAATTTCTGAGCACCTGTATCCATTTGGATCATTAGGGCTCAA
TTGCACATGGTTCAATTACAGTGGGTTTTCCCAGATTTTAGAGTTAGAGGCAGCAGGATCAGAAAATTAATCC
ATTTGCACTAGGTAATAAATTTGATCCCACCTATCTCAAAAACAAAACACTAGCCACACGTGGCAGCACACACC
TTTTACAACAGGACTCAGGAGCCTGGCATGATGGACAGACCTTTACTCCCTGCACTTGAGGCAGATGCAGGCAA
ATCTAGGCATCCTGGTGTACATATGAAGTTCAGGCAAGCCAGGGCCACGTAGGCTCAAAGACg

FIGURA 18

ID secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO:9	CUR-0292	T*T*G*G*T*A*T*T*C*A*C*A*A*G
SEQ ID NO:10	CUR-0293	A*A*A*C*T*G*G*A*A*A*C*C*T*A
SEQ ID NO:11	CUR-0294	G*A*T*C*T*T*T*A*T*G*A*G*A*A
SEQ ID NO:12	CUR-0295	G*A*T*G*G*A*G*A*A*A*T*T*G*G
SEQ ID NO:13	CUR-0296	A*G*T*C*T*G*A*T*G*G*A*G*A*A
SEQ ID NO:14	CUR-0297	T*G*T*T*A*A*G*G*G*A*T*G*T*C
SEQ ID NO:15	CUR-0298	A*A*T*C*T*G*C*T*T*T*T*G*T*T
SEQ ID NO:16	CUR-0299	A*G*G*G*A*A*T*T*G*A*A*A*T*C
SEQ ID NO:17	CUR-0300	T*A*A*G*G*C*A*A*G*A*T*T*T*C
SEQ ID NO:18	CUR-0301	T*A*A*A*T*G*G*A*G*T*T*A*A*G
SEQ ID NO:19	CUR-0302	T*T*A*T*T*T*A*T*A*G*C*A*C*A
SEQ ID NO:20	CUR-0303	T*T*G*C*T*T*C*T*G*C*T*T*A*T
SEQ ID NO:21	CUR-0304	A*A*A*A*A*A*A*T*A*T*T*T*G*C
SEQ ID NO:22	CUR-0305	C*A*G*C*C*T*T*A*A*A*A*A*A*A
SEQ ID NO:23	CUR-0306	T*T*T*T*A*A*A*A*C*C*T*C*T*C
SEQ ID NO:24	CUR-0307	T*A*G*T*T*C*A*G*A*T*T*T*T*T
SEQ ID NO:25	CUR-0308	A*G*C*A*G*T*T*G*C*T*A*A*A*T
SEQ ID NO:26	CUR-0309	C*T*G*A*G*T*G*C*A*G*C*A*G*C

FIGURA 19

ID Secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO:27	CUR-0245	G*T*C*T*G*A*T*G*G*A*G*A
SEQ ID NO:28	CUR-0736/ CUR-0963	+G*+T*C*T*G*A*T*G*G*+A*+G*+A
SEQ ID NO:29	CUR-0688	+G*+T*C*T*G*A*T*G*G*A*+G*+A
SEQ ID NO:30	CUR-0740	+G*mU*mC*+T*mG*mA*+T*mG*mG*+A*mG*mA
SEQ ID NO:31	CUR-0664	mG*mU*mC*mU*mG*mA*mU*mG*mG*mA*mG*mA

FIGURA 20

ID Secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO:32	sirtas_5	ACTGACACCTAATTGTATTACATGAA
SEQ ID NO:33	sirtas_6	TGAGCAGCAGTTGCTAAATTAGTCA
SEQ ID NO:34	sirtas_7	TCTACCTACATTATATCATAGCTCCTA

FIGURA 21

ID Secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO:35	CUR-1230	T*T*G*G*T*A*T*T*C*A*C*A*A*G*T*G*A*A*A
SEQ ID NO:36	CUR-1231	T*T*G*C*T*A*A*A*T*T*A*G*T*T*C*A*G*A*T
SEQ ID NO:37	CUR-1232	G*C*A*G*C*A*G*C*A*G*T*T*G*C*T*A*A*A*T
SEQ ID NO:38	CUR-1233	G*C*A*G*T*T*G*C*T*A*A*A*T*T*A*G*T*T*C

FIGURA 22

ID Secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO:39	CUR-1302	G*C*C*A*T*G*T*T*G*C*C*A*G*T*C*A*G*T
SEQ ID NO:40	CUR-1304	G*G*G*C*T*C*T*G*C*T*A*C*T*T*A*C*T*T*G*C
SEQ ID NO:41	CUR-1303	C*C*C*A*G*T*C*T*T*C*A*G*C*C*T*T*G*T*C*T
SEQ ID NO:42	CUR-1305	G*G*G*T*C*T*C*T*G*T*C*A*T*A*T*G*T*T*C*T*T

FIGURA 23

ID Secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO:43	CUR-1264	T*T*C*C*T*A*C*C*T*T*C*C*C*T*C*A*T*A
SEQ ID NO:44	CUR-1265	A*T*T*C*C*T*A*C*C*T*T*C*C*C*T*C*A*T
SEQ ID NO:45	CUR-1266	C*C*T*T*A*G*G*G*T*G*C*A*G*C*T*A*A*T*T

FIGURA 24

ID Secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO:46	CUR-1294	A*T*C*C*A*G*C*T*A*C*T*C*A*G*G*A*G*G*C
SEQ ID NO:47	CUR-1297	T*C*T*G*G*C*T*G*A*G*T*G*C*A*G*T*G*G*C*T
SEQ ID NO:48	CUR-1295	C*C*T*G*G*G*A*G*T*T*G*G*A*G*G*T*T*G*C*A
SEQ ID NO:49	CUR-1296	C*A*G*A*T*C*C*A*T*G*A*A*G*C*C*A*G*A*G
SEQ ID NO:50	CUR-1298	C*T*G*A*C*T*G*C*A*T*C*G*A*G*A*G*T*G*G

FIGURA 25

ID Secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO: 51	CUR-1381	G*C*C*C*A*T*C*T*G*C*T*T*G*C*T*T*G*A*T
SEQ ID NO: 52	CUR-1382	A*T*C*C*T*C*A*C*C*A*A*G*T*C*T*T*G*T
SEQ ID NO: 53	CUR-1383	G*C*T*T*A*C*T*T*C*C*T*C*C*T*C*C*T*T*T
SEQ ID NO: 54	CUR-1384	C*C*A*G*G*T*G*A*T*A*G*G*A*G*C*A*G*A*A*C*T

FIGURA 26

ID Secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO: 55	CUR-0842	A*C*C*C*T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*C*T*C*T*C*T
SEQ ID NO: 56	CUR-0843	C*C*A*C*T*C*T*C*C*T*T*C*T*G*T*C*A*T*C*T
SEQ ID NO: 57	CUR-0844	C*C*T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*C*T*C*T*C*T*C*T
SEQ ID NO: 58	CUR-0845	G*T*C*T*G*T*C*C*C*A*T*C*A*T*G*C*C*A*G*G
SEQ ID NO: 59	CUR-0846	T*T*T*C*T*G*A*T*C*C*T*G*C*T*G*C*C*T*C*T
SEQ ID NO: 60	CUR-0948	A*C*C*C*T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*C
SEQ ID NO: 61	CUR-0949	C*T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*C*T*C
SEQ ID NO: 62	CUR-0950	C^T^C^C^T^T^C^C^T^C^C
SEQ ID NO: 63	CUR-0951	C*T*T*C*C*T*C*C*C*T*C*T*C*T*C
SEQ ID NO: 64	CUR-0952	A*T*C*C*T*G*C*T*G*C*C*T*C*T
SEQ ID NO: 65	CUR-1098	+C*+T*C*C*T*T*C*C*T*C*C*+C*+T*+C
SEQ ID NO: 66	CUR-1099	+A*+C*C*C*T*C*C*T*T*C*C*T*+C*+C*+C

FIGURA 27

ID Secuencia	Secuencia
SEQ ID NO: 67	AACTGGAGCTGGGGTGTCTGTTTCA
SEQ ID NO: 68	CCATCAGACGACATCCCTTAACAAA
SEQ ID NO: 69	ACATTATATCATAGCTCCTAAAGGAGATGCA
SEQ ID NO: 70	CAGAGTTTCAATTCCC

FIGURA 28

ID Secuencia	Nombre SEQ	Secuencia
SEQ ID NO: 71	CUR-962	+G*+C*T*A*G*T*C*T*G*+T*+T*+G