

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 478**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01N 43/04 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 31/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09015323 .0**

96 Fecha de presentación: **10.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2194128**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.06.2010**

54 Título: **Composiciones y métodos para inhibir la expresión del gen PCSK9**

30 Prioridad:

11.05.2006 US 799458

27.06.2006 US 817203

25.08.2006 US 840089

18.10.2006 US 829914

13.02.2007 US 901134

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

11.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

11.12.2012

73 Titular/es:

ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
300 THIRD STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US

72 Inventor/es:

TAN, PAMELA;
BRAMLAGE, BIRGIT;
FRANK-KAMENETSKY, MARIA;
FITZGERALD, KEVIN;
AKINC, AKIN y
KOTELIANSKI, VICTOR E.

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 392 478 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

Composiciones y métodos para inhibir la expresión del gen PCSK9

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), y a su uso en la mediación de la interferencia por ARN para inhibir la expresión del gen PCSK9 y al uso del ARNbc para tratar procesos patológicos que pueden mediarse mediante la regulación por disminución de CSK9, tal como hiperlipidemia.

10 Antecedentes de la invención

La proproteína convertasa subtilisina kexina 9 (PCSK9) es un miembro de la familia de subtilisina serina proteasa. Las otras ocho subtilisina proteasas de mamíferos, PCSK1-PCSK8 (también denominadas PC1/3, PC2, furina, PC4, PC5/6, PACE4, PC7 y S1P/SKI-1) son proproteína convertasas que procesan una amplia variedad de proteínas en la ruta secretora y desempeñan papeles en diversos procesos biológicos (Bergeron F. (2000) J. Mol. Endocrinol. 24, 1-22, Gensberg, K., (1998) Semin. Cell Dev. Biol. 9, 11-17, Seidah, N. G. (1999) Brain Res. 848, 45-62, Taylor, N. A., (2003) FASEB J 17, 1215-1227, y Zhou, A., (1999) J. Biol. Chem 274, 20745-20748). Se ha propuesto que PCSK9 desempeña un papel en el metabolismo del colesterol. La expresión de ARNm de PCSK9 está regulada por disminución por el colesterol de la dieta con la que se alimentan ratones (Maxwell, K. N., (2003) J. Lipid Res. 44, 2109-2119), regulado por incremento por estatinas en células HepG2 (Dubuc, G., (2004) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24, 1454-1459) y regulado por incremento en ratones transgénicos para la proteína de unión al elemento regulador de esteroles (SREBP) (Horton, J. D., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 12027-12032), similar a las enzimas biosintéticas del colesterol y el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR). Además, se ha encontrado que mutaciones de cambio de sentido de PCSK9 están asociadas con una forma de hipercolesterolemia dominante autosómica (Hchola3) (Abifadel, M. *et al.*, (2003) Nat. Genet. 34, 154-156, Timms, K. M., (2004) Hum. Genet. 114, 343-353, Lerer, T. P. (2004) Clin. Genet. 65, 419-422). PCSK9 también puede desempeñar un papel en la determinación de los niveles de colesterol de LDL en la población general porque se han asociado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) con los niveles de colesterol en una población japonesa (Shioji, K., (2004) J. Hum. Genet. 49, 109-114).

Las hipercolesterolemias dominantes autosómicas (ADH) son enfermedades monogénicas en las que los pacientes presentan niveles de colesterol de LDL y total elevados, xantomas en tendones y aterosclerosis prematura (Rader, D. J., (2003) J. Clin. Invest. 111, 1795-1803). La patogénesis de las ADH y una forma recesiva, hipercolesterolemia recesiva autosómica (ARH) (Cohen, J. C., (2003) Curr. Opin. Lipidol. 14, 121-127), se debe a defectos en la captación de LDL por el hígado. La ADH puede estar provocada por mutaciones de LDLR, que impiden la captación de LDL, o por mutaciones en la proteína en LDL, apolipoproteína B, que se une al LDLR. La ARH está provocada por mutaciones en la proteína de ARH que son necesarias para la endocitosis del complejo LDLR-LDL mediante su interacción con clatrina. Por tanto, si mutaciones de PCSK9 son agentes causantes en familias con Hchola3, parece probable que PCSK9 desempeñe un papel en la captación de LDL mediada por receptores.

Estudios de sobreexpresión apuntan a un papel de PCSK9 en el control de los niveles de LDLR y, por tanto, la captación de LDL por el hígado (Maxwell, K. N. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 7100-7105, Benjannet, S., *et al.* (2004) J. Biol. Chem. 279, 48865-48875, Park, S. W., (2004) J. Biol. Chem. 279, 50630-50638). La sobreexpresión mediada por adenovirus de PCSK9 humano o de ratón durante 3 ó 4 días en ratones da como resultado niveles de colesterol de LDL y total elevados; este efecto no se observa en animales deficientes en LDLR (Maxwell, K. N. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 7100-7105, Benjannet, S., *et al.* (2004) J. Biol. Chem. 279, 48863-48875, Park, S. W., (2004) J. Biol. Chem. 279, 50630-50638). Además, la sobreexpresión de PCSK9 da como resultado una grave reducción en proteína de LDLR hepática, sin afectar a los niveles de ARNm de LDLR, los niveles de proteína SREBP o la razón de proteína SREBP nuclear con respecto a citoplasmática. Estos resultados indican que PCSK9, o bien directa o bien indirectamente, reduce los niveles de proteína de LDLR mediante un mecanismo postranscripcional.

Se han diseñado mutaciones de pérdida de función en PCSK9 en modelos de ratón (Rashid *et al.*, (2005) PNAS, 102, 5374-5379), y se han identificado en individuos humanos (Cohen *et al.*, (2005), Nature Genetics., 37, 161-165). En ambos casos, la pérdida de la función de PCSK9 conduce a una disminución del colesterol de LDLc y total. En un estudio de desenlace retrospectivo a lo largo de 15 años, se mostró que la pérdida de una copia de PCSK9 disminuía LDLc y conducía a una protección con riesgo-beneficio aumentada frente al desarrollo de cardiopatía cardiovascular (Cohen *et al.*, 2006 N. Engl. J. Med., 354., 1264-1372). Claramente, las pruebas hasta la fecha indican que la disminución de los niveles de PCSK9 disminuirá LDLc.

Recientemente, se ha mostrado que moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) bloquean la expresión génica en un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia por ARN (iARN). El documento WO 99/32619 (Fire *et al.*) describe el uso de ARNbc de al menos 25 nucleótidos de longitud para inhibir la expresión de genes en *C. elegans*. Se ha mostrado también que ARNbc degrada ARN diana en otros organismos, incluyendo plantas (véase, por ejemplo, el documento WO 99/53050, Waterhouse *et al.*, y el documento WO 99/61631, Heifetz

et al.), *Drosophila* (véase, por ejemplo, Yang, D., *et al.*, Curr. Biol. (2000) 10:1191-1200) y mamíferos (véase el documento WO 00/44895, Limmer; y el documento DE 101 00 586.5, Kreutzer *et al.*). Este mecanismo natural se ha convertido en el centro del desarrollo de una nueva clase de agentes farmacéuticos para tratar trastornos que están provocados por la regulación aberrante o no deseada de un gen.

A pesar de avances significativos en el campo de iARN y avances en el tratamiento de procesos patológicos que pueden estar mediados por la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9, sigue habiendo una necesidad de agentes que puedan inhibir la expresión del gen PCSK9 y que puedan tratar enfermedades asociadas con la expresión del gen PCSK9 tales como hiperlipidemia.

Sumario de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones.

La invención proporciona una solución al problema de tratar enfermedades que pueden modularse mediante la regulación por disminución de la proproteína convertasa subtilisina kexina 9 (PCSK9) usando ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para silenciar la expresión de PCSK9.

La invención proporciona ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) tal como se define en las reivindicaciones, así como composiciones y métodos *in vitro* para inhibir la expresión del gen PCSK9 en una célula usando tal ARNbc. La invención también proporciona tal ARNbc para su uso en el tratamiento de estados patológicos que pueden modularse mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9, tales como hiperlipidemia. El ARNbc de la invención comprende una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región que tiene menos de nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARNm del gen PCSK9.

En una realización, la invención proporciona moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión del gen PCSK9. El ARNbc comprende al menos dos secuencias que son complementarias entre sí. El ARNbc comprende una hebra sentido que comprende una primera secuencia y una hebra antisentido que comprende una segunda secuencia. La hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente complementaria a al menos parte de un ARNm que codifica para PCSK9, y la región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud. El ARNbc, tras hacer que contacte con una célula que expresa la PCSK9, inhibe la expresión del gen PCSK9 en al menos el 40%.

Según la invención, la primera secuencia del ARNbc es la secuencia de SEQ ID NO: 1229 o 1227 y la segunda secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 1230 o 1228, respectivamente. Las moléculas de ARNbc de la invención pueden estar compuestas por nucleótidos que se producen de manera natural o pueden estar compuestas de al menos un nucleótido modificado, tal como un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterol. Alternativamente, el nucleótido modificado puede elegirse del grupo de: un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-flúor, un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, nucleótido modificado con 2'-amino, nucleótido modificado con 2'-alquilo, nucleótido de morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural. Generalmente, tal secuencia modificada se basará en una primera secuencia de dicho ARNbc y una segunda secuencia tal como se definió anteriormente.

En otra realización, la invención proporciona una célula aislada que comprende uno de los ARNbc de la invención. La célula es generalmente una célula de mamífero, tal como una célula humana.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión del gen PCSK9 en un organismo, generalmente un sujeto humano, que comprende uno o más de los ARNbc de la invención y un vehículo de administración o portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención proporciona un método *in vitro* para inhibir la expresión del gen PCSK9 en una célula, que comprende las siguientes etapas:

(a) introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), siendo el ARNbc tal como se define en las reivindicaciones; y

(b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen PCSK9, inhibiendo de ese modo la expresión del gen PCSK9 en la célula.

En otra realización, la invención proporciona el ARNbc definido en las reivindicaciones para su uso en el tratamiento, la prevención o la gestión de procesos patológicos que pueden mediarse mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9, por ejemplo hiperlipidemia. Se describe por consiguiente la administración a un paciente que necesita tal tratamiento, prevención o gestión de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de

uno o más de los ARNbc de la invención.

En otra realización, la invención proporciona vectores para inhibir la expresión del gen PCSK9 en una célula, que comprende una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para al menos una hebra de uno de los ARNbc de la invención.

En otra realización, la invención proporciona una célula que comprende un vector para inhibir la expresión del gen PCSK9 en una célula. El vector comprende una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para al menos una hebra de uno de los ARNbc de la invención.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la estructura del lípido ND-98.

La figura 2 muestra los resultados de la selección *in vivo* de 16 ARNc de PCSK9 específicos de ratón (AL-DP-9327 hasta AL-DP-9342) dirigidos contra diferentes regiones de ORF del ARNm de PCSK9 (que tienen el primer nucleótido correspondiente a la posición de ORF indicada en el gráfico) en ratones C57/BL6 (5 animales/grupo). Se obtuvo el promedio de la razón de ARNm de PCSK9 con respecto a ARNm de GAPDH en lisados de hígado a lo largo de cada grupo de tratamiento y se comparó con un grupo control tratado con PBS o un grupo control tratado con un ARNc no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea).

La figura 3 muestra los resultados de la selección *in vivo* de 16 ARNc de PCSK9 que reaccionan de manera cruzada con ser humano/ratón/rata (AL-DP-9311 hasta AL-DP-9326) dirigidos contra diferentes regiones de ORF del ARNm de PCSK9 (que tienen el primer nucleótido correspondiente a la posición de ORF indicada en el gráfico) en ratones C57/BL6 (5 animales/grupo). Se calculó el promedio de la razón de ARNm de PCSK9 con respecto a ARNm de GAPDH en lisados de hígado a lo largo de cada grupo de tratamiento y se comparó con un grupo control tratado con PBS o un grupo control tratado con un ARNc no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea).

El silenciamiento del ARNm de PCSK9 dio como resultado una disminución de los niveles de colesterol sérico total.

Los ARNc más eficaces en cuanto a la inactivación del mensaje de PCSK9 mostraron el efecto hipocolesterolemizante más pronunciado (aproximadamente el 20-30%).

La figura 4 muestra los resultados de la selección *in vivo* de 16 ARNc de PCSK9 específicos de ratón (AL-DP-9327 hasta AL-DP-9342) en ratones C57/BL6 (5 animales/grupo). Se calcularon los promedios de los niveles de colesterol sérico total a lo largo de cada grupo de tratamiento y se compararon con un grupo control tratado con PBS o un grupo control tratado con un ARNc no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea).

La figura 5 muestra los resultados de la selección *in vivo* de 16 ARNc de PCSK9 que reaccionan de manera cruzada con ser humano/ratón/rata (AL-DP-9311 hasta AL-DP-9326) en ratones C57/BL6 (5 animales/grupo). Se calcularon los promedios de los niveles de colesterol sérico total a lo largo de cada grupo de tratamiento y se compararon con un grupo control tratado con PBS o un grupo control tratado con un ARNc no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea).

La figura 6 muestra una comparación de los resultados *in vitro* e *in vivo* para el silenciamiento de PCSK9.

La figura 7A y la figura 7B muestran los resultados *in vitro* para el silenciamiento de PCSK9 usando hepatocitos de mono primarios.

La figura 8 muestra la actividad *in vivo* de ARNbc formulados con LNP-01 frente a pcsk-9.

La figura 9 muestra la actividad *in vivo* de moléculas originales 9314 y 10792 modificadas químicamente formuladas con LNP-01 a diferentes tiempos. Claramente, versiones modificadas de 10792 presentan actividad de silenciamiento *in vivo*.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una solución al problema del tratamiento de enfermedades que pueden modularse mediante la regulación por disminución del gen PCSK9, usando ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para silenciar el gen PCSK9, proporcionando así tratamiento para enfermedades tales como hiperlipidemia.

La invención proporciona ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) como se define en las reivindicaciones, así como composiciones y métodos *in vitro* para inhibir la expresión del gen PCSK9 en una célula usando el ARNbc. La invención también proporciona tales ARNbc para su uso en el tratamiento de enfermedades y estados patológicos que pueden modularse mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9. ARNbc dirige la degradación específica de secuencia de ARNm a través de un proceso conocido como interferencia por ARN

(iARN).

El ARNbc de la invención comprende una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARNm del gen PCSK9. El uso de estos ARNbc permite la degradación seleccionada como diana de un ARNm que está implicado en el transporte de sodio. Usando ensayos en animales y basados en células, los presentes inventores han demostrado que dosificaciones muy bajas de estos ARNbc pueden mediar específica y eficazmente la iARN, dando como resultado una inhibición significativa de la expresión del gen PCSK9. Por tanto, las composiciones de la invención que comprenden estos ARNbc son útiles para tratar procesos patológicos que pueden mediar mediante la regulación por disminución de PCSK9, tal como en el tratamiento de hiperlipidemia.

La siguiente descripción detallada da a conocer cómo preparar y usar el ARNbc y las composiciones que contienen ARNbc para inhibir la expresión del gen PCSK9 diana, así como composiciones y métodos para tratar enfermedades que pueden modularse mediante la regulación por disminución de la expresión de PCSK9, tal como hiperlipidemia. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un ARNbc que tiene una hebra antisentido que comprende una región de complementariedad que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARN del gen PCSK9, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Por consiguiente, ciertos aspectos de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el ARNbc de la invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable, métodos *in vitro* de uso de las composiciones para inhibir la expresión del gen PCSK9 y ARNbc de la invención para su uso en el tratamiento de enfermedades que pueden modularse mediante la regulación por disminución de la expresión de PCSK9.

I. Definiciones

Por conveniencia, el significado de ciertos términos y frases usados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas se proporcionan a continuación. Si hay una discrepancia aparente entre el uso de un término en otras partes de esta memoria descriptiva y su definición proporcionada en esta sección, la definición en esta sección prevalecerá.

“G,” “C,” “A” y “U” representan cada una generalmente un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, se entenderá que el término “ribonucleótido” o “nucleótido” puede referirse también a un nucleótido modificado, tal como se detalla adicionalmente a continuación, o un resto de reemplazamiento sustituto. El experto es muy consciente de que la guanina, citosina, adenina y uracilo pueden reemplazarse por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que lleva tal resto de reemplazamiento. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base puede producir apareamiento de bases con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por tanto, pueden reemplazarse nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina en las secuencias de nucleótidos de la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. Secuencias que comprenden tales restos de reemplazamiento son realizaciones de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, “PCSK9” se refiere a la proteína o el gen de proproteína convertasa subtilisina kexina 9 (también conocida como FH3, HCHOLA3, NARC-1, NARC1). Se proporcionan secuencias de ARNm para PCSK9 como de ser humano: NM_174936; ratón: NM_153565 y rata: NM_199253.

Tal como se usa en el presente documento, “secuencia diana” se refiere a una parte contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción del gen PCSK9, incluyendo ARNm que es un producto de procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “hebra que comprende una secuencia” se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe mediante la secuencia a la que se hace referencia usando la nomenclatura de nucleótidos convencional.

Tal como se usa en el presente documento, y a menos que se indique lo contrario, el término “complementario”, cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridarse y formar una estructura de dúplex en ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, tal como entenderá el experto. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones rigurosas, pudiendo incluir las condiciones rigurosas: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50°C o 70°C durante 12-16 horas seguido por lavado. Pueden aplicarse otras condiciones, tales como condiciones fisiológicamente relevantes que pueden encontrarse dentro de un organismo. El experto podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias según la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

Esto incluye el apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos con el oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos a lo largo de toda la longitud de la primera y segunda secuencia de nucleótidos. Tales secuencias pueden denominarse “completamente complementarias” entre sí en el presente documento. Sin embargo, cuando una primera secuencia se denomina “sustancialmente complementaria” con respecto a una segunda secuencia en el presente documento, las dos secuencias puede ser completamente complementarias, o pueden formar uno o más, pero generalmente no más de 4, 3 ó 2 pares de bases apareados de manera errónea tras la hibridación, mientras que conservan la capacidad para hibridarse en las condiciones más relevantes para su aplicación final. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos están diseñados para formar, tras su hibridación uno o más proyecciones monocatenarias, tales proyecciones no deben considerarse apareamientos erróneos con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARN_{bc} que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en el que el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria al oligonucleótido más corto, puede denominarse aún “completamente complementario” para los fines de la invención.

Las secuencias “complementarias”, tal como se usa en el presente documento, pueden incluir también, o estar formadas enteramente por, pares de bases no Watson-Crick y/o pares de bases formados por nucleótidos no naturales y modificados, siempre que se satisfagan los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridarse.

Los términos “complementario”, “completamente complementario” y “sustancialmente complementario” en el presente documento pueden usarse con respecto a la coincidencia de bases entre la hebra sentido y la hebra antisentido de un ARN_{bc}, o entre la hebra antisentido de un ARN_{bc} y una secuencia diana, tal como se entenderá a partir del contexto de su uso.

Tal como se usa en el presente documento, un polinucleótido que es “sustancialmente complementario a al menos parte de” un ARN mensajero (ARN_m) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una parte contigua del ARN_m de interés (por ejemplo, que codifica para PCSK9). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARN_m de PCSK9 si la secuencia es sustancialmente complementaria a una parte no interrumpida de un ARN_m que codifica para PCSK9.

El término “ARN bicatenario” o “ARN_{bc}”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tiene una estructura de dúplex que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, tal como se definió anteriormente. Las dos hebras que forman la estructura de dúplex pueden ser diferentes partes de una molécula de ARN mayor, o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando son moléculas de ARN separadas, tales ARN_{bc} se denominan a menudo en la bibliografía ARN_{ic} (“ARN de interferencia corto”). Cuando las dos hebras son parte de una molécula mayor, y por tanto están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forman la estructura de dúplex, la cadena de ARN de conexión se denomina “bucle en horquilla”, “ARN de horquilla corto” o “ARN_{hc}”. Cuando las dos hebras están conectadas covalentemente por medios distintos de una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forman la estructura de dúplex, la estructura de conexión se denomina “ligador”. Las hebras de ARN pueden tener el mismo o un número diferentes de nucleótidos. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la hebra más corta del ARN_{bc} menos cualquier proyección que esté presente en el dúplex. Además de la estructura de dúplex, un ARN_{bc} puede comprender una o más proyecciones de nucleótidos. Además, tal como se usa en esta memoria descriptiva, “ARN_{bc}” puede incluir modificaciones químicas en ribonucleótidos, incluyendo modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos e incluyendo todos los tipos de modificaciones dadas a conocer en el presente documento o conocidas en la técnica. Cualquiera de tales modificaciones, tal como se usa en una molécula de tipo ARN_{ic}, se abarca mediante “ARN_{bc}” para los fines de esta memoria descriptiva y reivindicaciones.

Tal como se usa en el presente documento, una “proyección de nucleótidos” se refiere al nucleótido o nucleótidos desapareados que sobresalen de la estructura de dúplex de un ARN_{bc} cuando un extremo 3' de una hebra del ARN_{bc} se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa. “Romo” o “extremo romo” significa que no hay nucleótidos desapareados en el extremo del ARN_{bc}, es decir, no hay proyección de nucleótidos. Un ARN_{bc} con “extremos romos” es un ARN_{bc} que es bicatenario a lo largo de toda su longitud, es decir, sin proyección de nucleótidos en cualquier extremo de la molécula. Por claridad, caperuzas químicas o restos químicos distintos de nucleótidos conjugados al extremo 3' o extremo 5' de un ARN_{bc} no se consideran en la determinación de si un ARN_{bc} tiene una proyección o tiene extremos romos.

El término “hebra antisentido” se refiere a la hebra de un ARN_{bc} que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. Tal como se usa en el presente documento, el término “región de complementariedad” se refiere a la región en la hebra antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo una secuencia diana, tal como se define en el presente documento. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los apareamientos erróneos se toleran más en las regiones terminales y, si están presentes, están generalmente en una región o regiones

terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4, 3 ó 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3' terminal.

El término "hebra sentido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la hebra de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra antisentido.

"Introducir en una célula", cuando se hace referencia a un ARNbc, significa facilitar la captación o absorción en la célula, tal como entienden los expertos en la técnica. La absorción o captación de ARNbc puede producirse a través de procesos celulares activos o de difusión espontánea, o mediante dispositivos o agentes auxiliares. El significado de este término no se limita a células *in vitro*; también puede "introducirse en una célula" un ARNbc cuando la célula es parte de un organismo vivo. En tal caso, la introducción en la célula incluirá la administración al organismo. Por ejemplo, para administración *in vivo*, puede inyectarse ARNbc en un sitio tisular o administrarse de manera sistémica. La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en la técnica tales como electroporación y lipofección.

El término "silencio" y la expresión "inhibe la expresión de", siempre que se refieran al gen PCSK9, en el presente documento se refieren a la supresión al menos parcial de la expresión del gen PCSK9, tal como se manifiesta mediante una reducción de la cantidad de ARNm transcrito a partir del gen PCSK9 que puede aislarse a partir de una primera célula o grupo de células en las que el gen PCSK9 se transcribe y que se ha o han tratado de manera que se inhibe la expresión del gen PCSK9, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no se ha o han tratado así (células control). El grado de inhibición se expresa habitualmente en términos de:

$$\frac{(\text{ARNm en células control}) - (\text{ARNm en células tratadas})}{(\text{ARNm en células control})} \bullet 100\%$$

Alternativamente, el grado de inhibición puede facilitarse en cuanto a reducción de un parámetro que está vinculado funcionalmente a la transcripción del gen PCSK9, por ejemplo la cantidad de proteína codificada por el gen PCSK9 que se secreta por una célula, o el número de células que presentan un cierto fenotipo, por ejemplo apoptosis. En principio, puede determinarse el silenciamiento del gen PCSK9 en cualquier célula que exprese la diana, o bien de manera constitutiva o bien mediante ingeniería genómica, y mediante cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia con el fin de determinar si un ARNbc dado inhibe la expresión del gen PCSK9 en un cierto grado y por tanto está abarcado por la presente invención, el ensayo proporcionado en los ejemplos a continuación servirá como tal referencia.

Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión del gen PCSK9 se suprime en al menos aproximadamente el 20%, el 25%, el 35% o el 50% mediante la administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. En alguna realización, el gen PCSK9 se suprime en al menos aproximadamente el 60%, el 70% o el 80% mediante la administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. En algunas realizaciones, el gen PCSK9 se suprime en al menos aproximadamente el 85%, el 90% o el 95% mediante la administración del oligonucleótido bicatenario de la invención. Las tablas 1, 2 proporcionan un amplio intervalo de valores para la inhibición de la expresión obtenida en un ensayo *in vitro* usando diversas moléculas de ARNbc de PCSK9 a diversas concentraciones.

Tal como se usa en el presente documento en el contexto de la expresión de PCSK9, los términos "tratar", "tratamiento" y similares se refieren al alivio o la paliación de procesos patológicos que pueden medirse mediante la regulación por disminución del gen PCSK9. En el contexto de la presente invención, en lo que se refiere a cualquiera de los otros estados mencionados en el presente documento a continuación (distintos de procesos patológicos que pueden medirse mediante la regulación por disminución del gen PCSK9), los términos "tratar", "tratamiento" y similares significan calmar o aliviar al menos un síntoma asociado con tal estado, o ralentizar o revertir la evolución de tal estado. Por ejemplo, en el contexto de hiperlipidemia, el tratamiento implicará una disminución en los niveles de lípidos séricos.

Tal como se usa en el presente documento, las frases "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad profilácticamente eficaz" se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, la prevención o la gestión de procesos patológicos que pueden medirse mediante la regulación por disminución del gen PCSK3 o un síntoma manifiesto de procesos patológicos que pueden medirse mediante la regulación por disminución del gen PCSK9. La cantidad específica que es terapéuticamente eficaz puede determinarse fácilmente por un profesional médico habitual, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, el tipo de procesos patológicos que pueden medirse mediante la regulación por disminución del gen PCSK9, la edad e historia del paciente, el estadio de los procesos patológicos que pueden medirse mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9 y la administración de otros procesos antipatológicos que pueden medirse mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9.

Tal como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un ARNbc y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, "cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente

“cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de un ARN eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo previsto. Por ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera eficaz cuando hay al menos una reducción del 25% en un parámetro medible asociado con una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos una reducción del 25% en ese parámetro.

La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un portador para la administración de un agente terapéutico. Tales portadores incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos y se describen en más detalle a continuación. La expresión excluye específicamente medio de cultivo celular.

Tal como se usa en el presente documento, una “célula transformada” es una célula en la que se ha introducido un vector a partir del cual puede expresarse una molécula de ARNbc.

II. Ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc)

En una realización, la invención proporciona moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión del gen PCSK9 en una célula o mamífero, comprendiendo el ARNbc una hebra antisentido que comprende una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión del gen PCSK9, y en el que la región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, e inhibiendo dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho gen PCSK9, la expresión de dicho gen PCSK9 en al menos el 40%. El ARNbc comprende dos hebras de ARN que son suficientemente complementarias como para hibridarse para formar una estructura de dúplex. Una hebra del ARNbc (la hebra antisentido) comprende una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y en general completamente complementaria, a una secuencia diana, derivada de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión del gen PCSK9, la otra hebra (la hebra sentido) comprende una región que es complementaria a la hebra antisentido, de manera que las dos hebras se hibridan y forman una estructura de dúplex cuando se combinan en condiciones adecuadas. Generalmente, la estructura de dúplex tiene entre 15 y 30, más generalmente entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24, y lo más generalmente entre 19 y 21 pares de bases de longitud. De manera similar, la región de complementariedad con la secuencia diana tiene entre 15 y 30, más generalmente entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24, y lo más generalmente entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. El ARNbc de la invención puede comprender además una o más proyecciones de nucleótidos bicatenarias. El ARNbc puede sintetizarse mediante métodos convencionales conocidos en la técnica tal como se comenta adicionalmente a continuación, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de ADN automático, tal como están disponibles comercialmente de, por ejemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc. En una realización preferida, el gen PCSK9 es el gen PCSK9 humano. Las secuencias de hebra sentido y antisentido son tal como se definieron anteriormente.

El experto es muy consciente de que ARNbc que comprenden una estructura de dúplex de entre 20 y 23, pero específicamente 21, pares de bases se han considerado como particularmente eficaces en la inducción de la interferencia por ARN (Elbashir *et al.*, EMBO 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros han encontrado que ARNbc más cortos o más largos pueden ser eficaces también. En las realizaciones descritas anteriormente, en virtud de la naturaleza de las secuencias de oligonucleótidos proporcionadas en las tablas 1 y 2, los ARNbc de la invención pueden comprender al menos una hebra de una longitud de como mínimo 21 nt. Puede esperarse razonablemente que ARNbc más cortos que comprenden una de las secuencias de las tablas 1 y 2 menos sólo unos cuantos nucleótidos en uno o ambos extremos puedan ser similarmente eficaces en comparación con los ARNbc descritos anteriormente. Por tanto, la invención contempla ARNbc que comprenden una secuencia parcial de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de una de las secuencias de las tablas 1 y 2, y que difieren en su capacidad para inhibir la expresión del gen PCSK9 en un ensayo de FACS tal como se describe en el presente documento a continuación en no más del 5, 10, 15, 20, 25 ó 30% de inhibición con respecto a un ARNbc que comprende la secuencia completa. Pueden prepararse fácilmente ARNbc adicionales que escinden dentro de la secuencia diana proporcionada en las tablas 1 y 2 usando la secuencia de PCSK9 y la secuencia diana proporcionada.

Además, los agentes de iARN proporcionados en las tablas 1 y 2 identifican un sitio en el ARNm de PCSK9 que es susceptible de escisión basada en iARN. Se describen agentes de iARN adicionales que seleccionan como diana dentro de la secuencia seleccionada como diana por uno de los agentes de la presente invención. Tal como se usa en el presente documento, se dice que un segundo agente de iARN selecciona como diana dentro de la secuencia de un primer agente de iARN si el segundo agente de iARN escinde el mensaje en cualquier lugar dentro del ARNm que es complementario a la hebra antisentido del primer agente de iARN. Un segundo agente de este tipo consistirá generalmente en al menos 15 nucleótidos contiguos de una de las secuencias proporcionadas en las tablas 1 y 2 acoplados a secuencias de nucleótidos adicionales tomadas de la región contigua a la secuencia seleccionada en el gen PCSK9. Por ejemplo, los últimos 15 nucleótidos de SEQ ID NO:1 (menos las secuencias AA añadidas) combinados con los siguientes 6 nucleótidos del gen PCSK9 diana producen un agente de hebra única de 21 nucleótidos que se basa en una de las secuencias proporcionadas en las tablas 1 y 2.

También se describe un ARNbc que contiene uno o más apareamientos erróneos con la secuencia diana. El ARNbc puede contener no más de 3 apareamientos erróneos. Si la hebra antisentido del ARNbc contiene apareamientos erróneos con una secuencia diana, es preferible que la zona de apareamiento erróneo no esté ubicada en el centro de la región de complementariedad. Si la hebra antisentido del ARNbc contiene apareamientos erróneos con la

5 secuencia diana, es preferible que el apareamiento erróneo se restrinja a 5 nucleótidos de cualquier extremo, por ejemplo 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótido del extremo o bien 5' o bien 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, para una hebra de ARNbc de 23 nucleótidos que es complementaria a una región del gen PCSK9, el ARNbc generalmente no contiene ningún apareamiento erróneo dentro de los 13 nucleótidos centrales. Los métodos

10 descritos pueden usarse para determinar si un ARNbc que contiene un apareamiento erróneo con una secuencia diana es eficaz en la inhibición de la expresión del gen PCSK9. La consideración de la eficacia de los ARNbc con apareamientos erróneos en la inhibición de la expresión del gen PCSK9 es importante, especialmente si se sabe que la región de complementariedad particular en el gen PCSK9 tiene una variación de secuencia polimórfica dentro de la población.

15 Al menos un extremo del ARNbc puede tener una proyección de nucleótidos monocatenaria de 1 a 4, generalmente 1 ó 2 nucleótidos. ARNbc que tienen al menos una proyección de nucleótidos tienen propiedades inhibitoras inesperadamente mejores que sus homólogos de extremos romos. Además, los presentes inventores han descubierto que la presencia de sólo una proyección de nucleótidos refuerza la actividad de interferencia del ARNbc, sin afectar a su estabilidad global. ARNbc que tiene sólo una proyección ha demostrado ser particularmente estable

20 y eficaz *in vivo*, así como en una variedad de células, medios de cultivo celular, sangre y suero. Generalmente, la proyección monocatenaria está ubicada en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido o, alternativamente, en el extremo 3' terminal de la hebra sentido. El ARNbc puede tener también un extremo romo, generalmente ubicado en el extremo 5' de la hebra antisentido. Tales ARNbc tienen actividad inhibitora y estabilidad mejoradas, permitiendo así su administración a dosificaciones bajas, es decir, menos de 5 mg/kg de peso corporal del receptor al día.

25 Generalmente, la hebra antisentido del ARNbc tiene una proyección de nucleótidos en el extremo 3', y el extremo 5' es romo. Uno o más de los nucleótidos en la proyección puede reemplazarse por un nucleósido tiofosfato.

El ARNbc puede modificarse químicamente para potenciar la estabilidad. Los ácidos nucleicos de la invención pueden sintetizarse y/o modificarse mediante métodos bien establecidos en la técnica, tales como los descritos en

30 "Current protocols in nucleic acid chemistry". Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU., que se incorpora por el presente documento en el presente documento como referencia. Las modificaciones químicas pueden incluir, pero sin limitarse a modificaciones 2', modificaciones en otros sitios del azúcar o la base de un oligonucleótido, introducción de bases no naturales en la cadena oligonucleotídica, unión covalente a un ligando o resto químico y reemplazamiento de enlaces fosfato internucleotídicos por enlaces alternativos tales como

35 tiofosfatos. Puede emplearse más de una modificación de este tipo.

La unión química de las dos hebras de ARNbc separadas puede lograrse mediante cualquiera de una variedad de técnicas bien conocidas, por ejemplo introduciendo enlaces covalentes, iónicos o de hidrógeno; interacciones

40 hidrófobas, interacciones de van der Waals o de apilamiento; por medio de coordinación de metal-ión, o a través del uso de análogos de purina. Generalmente, los grupos químicos que pueden usarse para modificar el ARNbc incluyen, sin limitación, azul de metileno; grupos bifuncionales, generalmente bis-(2-cloroetil)amina; N-acetil-N'-(p-glioxilbenzoil)cistamina; 4-tiouracilo; y psoraleno. El ligador puede ser ligador de hexaetilenglicol. En este caso, los ARNbc se producen mediante síntesis en fase sólida y el ligador de hexaetilenglicol se incorpora según métodos

45 convencionales (por ejemplo, Williams, D.J., y K.B. Hall, *Biochem.* (1996) 35:14665-14670). En una realización particular, el extremo 5' de la hebra antisentido y el extremo 3' de la hebra sentido se unen químicamente mediante un ligador de hexaetilenglicol. Al menos un nucleótido del ARNbc puede comprender grupos fosforotioato o fosforoditioato. El enlace químico en ambos extremos del ARNbc se forma generalmente mediante enlaces de triple hélice. Las tablas 1 y 2 proporcionan ejemplos de agentes de iARN modificados.

50 Los nucleótidos en una o ambas de las dos hebras individuales pueden modificarse para impedir o inhibir las actividades de degradación de enzimas celulares, tales como, por ejemplo, sin limitación, ciertas nucleasas. Se conocen en la técnica técnicas para inhibir la actividad de degradación de enzimas celulares contra ácidos nucleicos incluyendo, pero sin limitarse a, modificaciones de 2'-aminoazúcar, modificaciones de 2'-F-azúcar, modificaciones de 2'-F, modificaciones de 2'-alquil-azúcar, modificaciones de estructura principal no cargada, modificaciones de

55 morfolino, modificaciones de 2'-O-metilo y fosforamidato (véase, por ejemplo, Wagner, *Nat. Med.* (1995) 1; 1116-8). Por tanto, al menos un grupo 2'-hidroxilo de los nucleótidos en un ARNbc se reemplaza por un grupo químico, generalmente por un grupo 2'-amino o un grupo 2'-metilo. Además, al menos un nucleótido puede modificarse para formar un nucleótido bloqueado. Tal nucleótido bloqueado contiene un puente de metileno que conecta el oxígeno 2' de la ribosa con el carbono 4' de la ribosa. Se describen oligonucleótidos que contienen el nucleótido bloqueado en

60 Koshkin. A.A, *et al.*, *Tetrahedron* (1998), 54:3607-3630) y Obika, S, *et al.*, *Tetrahedron Lett.* (1998), 39: 5401-5404). La introducción de un nucleótido bloqueado en un oligonucleótido mejora la afinidad por secuencias complementarias y aumenta la temperatura de fusión en varios grados (Braasch, D.A. y D.R. Corey, *Chem. Biol.* (2001), 8:1-7).

65 La conjugación de un ligando a un ARNbc puede potenciar su absorción celular así como su direccionamiento a un tejido particular o captación por tipos específicos de células tales como células hepáticas. En ciertos casos, se

conjuga un ligando hidrófobo con el ARNbc para facilitar la permeación directa de la membrana celular y/o la captación a través de las células hepáticas. Alternativamente, el ligando conjugado con el ARNbc es un sustrato para la endocitosis mediada por receptor. Estos enfoques se han usado para facilitar la permeación celular de oligonucleótidos antisentido así como agentes de ARNbc. Por ejemplo, se ha conjugado colesterol con diversos oligonucleótidos antisentido dando como resultado compuestos que son sustancialmente más activos en comparación con sus análogos no conjugados. Véase M. Manoharan *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 2002, 12, 103. Otros compuestos lipófilos que se han conjugado con oligonucleótidos incluyen ácido 1-pirenobutírico, 1,3-bis-O-(hexadecil)glicerol y mentol. Un ejemplo de un ligando para la endocitosis mediada por receptor es ácido fólico. El ácido fólico entra en la célula mediante endocitosis mediada por receptor de folato. Compuestos de ARNbc que llevan ácido fólico se transportarían eficazmente al interior de la célula mediante la endocitosis mediada por receptor de folato. Li y colaboradores notifican que la unión de ácido fólico al extremo 3' terminal de un oligonucleótido dio como resultado un aumento de 8 veces en la captación celular del oligonucleótido. Li, S.; Deshmukh, H.M.; Huang, L. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1540. Otros ligandos que se han conjugado con oligonucleótidos incluyen polietilenglicoles, agrupaciones de hidratos de carbono, agentes de reticulación, conjugados de porfirina, péptidos de administración y lípidos tales como colesterol.

En ciertos casos, la conjugación de un ligando catiónico con oligonucleótidos da como resultado resistencia mejorada a nucleasas. Ejemplos representativos de ligandos catiónicos son propilamonio y dimetilpropilamonio. De manera interesante, se notificó que oligonucleótidos antisentido conservan su alta afinidad de unión a ARNm cuando el ligando catiónico se dispersaba por todo el oligonucleótido. Véase M. Manoharan *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 2002, 12, 103 y referencias citadas en el mismo.

El ARNbc conjugado con ligando de la invención puede sintetizarse mediante el uso de un ARNbc que lleva una funcionalidad reactiva colgante, tal como la derivada de la unión de una molécula de unión sobre el ARNbc. Este oligonucleótido reactivo puede reaccionar directamente con ligandos disponibles comercialmente, ligandos que se sintetizan que llevan cualquiera de una variedad de grupos protectores, o ligandos que tienen un resto de unión unido a los mismos. Los métodos de la invención facilitan la síntesis de ARNbc conjugado con ligando mediante el uso de, en algunas realizaciones preferidas, monómeros de nucleósido que se han conjugado apropiadamente con ligandos y que pueden unirse adicionalmente con un material de soporte sólido. Tales conjugados de ligando-nucleósido, opcionalmente unidos a un material de soporte sólido, se preparan según algunas realizaciones preferidas de los métodos de la invención mediante la reacción de un ligando de unión a suero seleccionado con un resto de unión ubicado en la posición 5' de un nucleósido u oligonucleótido. En ciertos casos, se prepara un ARNbc que lleva un ligando de aralquilo unido al extremo 3' terminal del ARNbc uniendo covalentemente en primer lugar un elemento estructural de monómero a un soporte de vidrio de poro controlado mediante un grupo aminoalquilo de cadena larga. Entonces, se unen nucleótidos mediante técnicas de síntesis en fase sólida convencionales al elemento estructural de monómero unido al soporte sólido. El elemento estructural de monómero puede ser un nucleósido u otro compuesto orgánico que es compatible con la síntesis en fase sólida.

El ARNbc usado en los conjugados de la invención puede prepararse de manera conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis lo venden varios proveedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Puede emplearse adicional o alternativamente cualquier otro medio para tal síntesis conocido en la técnica. También se sabe usar técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

Pueden encontrarse enseñanzas referentes a la síntesis de oligonucleótidos modificados particulares en las siguientes patentes de EE.UU.: patentes de EE.UU. n.ºs 5.138.045 y 5.218.105, que describen oligonucleótidos conjugados con poliamina; la patente de EE.UU. n.º 5.212.295, que describe monómeros para la preparación de oligonucleótidos que tienen enlaces de fósforo quirales; patentes de EE.UU. n.ºs 5.378.825 y 5.541.307, que describen oligonucleótidos que tienen estructuras principales modificadas; la patente de EE.UU. n.º 5.386.023, que describe oligonucleótidos de estructura principal modificada y la preparación de los mismos a través de acoplamiento reductor; la patente de EE.UU. n.º 5.457.191, que describe nucleobases modificadas basadas en el sistema de anillos de 3-desazapurina y métodos de síntesis de los mismos; la patente de EE.UU. n.º 5.459.255, que describe nucleobases modificadas basadas en purinas N-2 sustituidas; la patente de EE.UU. n.º 5.521.302, que describe procedimientos para preparar oligonucleótidos que tienen enlaces de fósforo quirales; la patente de EE.UU. n.º 5.539.082, que describe ácidos nucleicos peptídicos; la patente de EE.UU. n.º 5.554.746, que describe oligonucleótidos que tienen estructuras principales de β -lactama; la patente de EE.UU. n.º 5.571.902, que describe métodos y materiales para la síntesis de oligonucleótidos; la patente de EE.UU. n.º 5.578.718, que describe nucleósidos que tienen grupos alquiltio, en la que tales grupos pueden usarse como ligadores con otros restos unidos en cualquiera de una variedad de posiciones del nucleósido; las patentes de EE.UU. n.ºs 5.587.361 y 5.599.797, que describen oligonucleótidos que tienen enlaces fosforotioato de alta pureza quiral; la patente de EE.UU. n.º 5.506.351, que describe procedimientos para la preparación de 2'-O-alkil-guanosina y compuestos relacionados, incluyendo compuestos de 2,6-diaminopurina; la patente de EE.UU. n.º 5.587.469, que describe oligonucleótidos que tienen purinas N-2 sustituidas; la patente de EE.UU. n.º 5.587.470, que describe oligonucleótidos que tienen 3-desazapurinas; la patente de EE.UU. n.º 5.223.618 y la patente de EE.UU. n.º 5.608.046, que describen ambos análogos de nucleósidos de 4'-desmetilo conjugados; las patentes de EE.UU. n.ºs 5.602.240 y 5.610.289, que describen análogos de oligonucleótidos de estructura principal modificada; las patentes

de EE.UU. n.^{os} 6.262.241 y 5.459.255, que describen, entre otros, métodos de síntesis de 2'-fluoro-oligonucleótidos.

En el ARNbc conjugado con ligando y los nucleósidos unidos específicos de secuencia que llevan molécula de ligando de la invención, los oligonucleótidos y oligonucleósidos pueden ensamblarse en un sintetizador de ADN adecuado utilizando precursores de nucleótidos o nucleósidos, o precursores de conjugados de nucleótidos o nucleósidos que ya llevan el resto de unión, precursores de conjugados de ligando-nucleótido o nucleósido que ya llevan la molécula de ligando, o elementos estructurales que llevan ligando no nucleosídico.

Cuando se usan precursores de conjugados de nucleótidos que ya llevan un resto de unión, la síntesis de los nucleósidos unidos específicos de secuencia se completa normalmente, y la molécula de ligando se hace reaccionar entonces con el resto de unión para formar el oligonucleótido conjugado con ligando. Se han descrito previamente conjugados de oligonucleótidos que llevan una variedad de moléculas tales como esteroides, vitaminas, lípidos y moléculas indicadoras (véase Manoharan *et al.*, solicitud PCT WO 93/07883). En una realización preferida, los oligonucleótidos o nucleósidos unidos de la invención se sintetizan mediante un sintetizador automático usando fosforamiditas derivadas de conjugados de ligando-nucleósido además de las fosforamiditas convencionales y fosforamiditas no convencionales que están disponibles comercialmente y se usan de manera rutinaria en la síntesis de oligonucleótidos.

La incorporación de un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-alilo, 2'-O-aminoalquilo o 2'-desoxi-2'-flúor en nucleósidos de un oligonucleótido confiere propiedades de hibridación potenciadas al oligonucleótido. Además, oligonucleótidos que contienen estructuras principales de fosforotioato tienen una estabilidad frente a nucleasas potenciada. Por tanto, nucleósidos unidos, funcionalizados de la invención pueden aumentarse para incluir cualquiera o tanto una estructura de fosforotioato como un grupo 2'-O-metilo, 2'-O-etilo, 2'-O-propilo, 2'-O-aminoalquilo, 2'-O-alilo o 2'-desoxi-2'-flúor. Se encuentra un resumen que enumera algunas de las modificaciones de oligonucleótidos conocidas en la técnica en, por ejemplo, la publicación PCT WO 200370918.

En algunas realizaciones, se preparan secuencias de nucleósidos funcionalizados de la invención que poseen un grupo amino en el extremo 5' terminal usando un sintetizador de ADN, y entonces se hacen reaccionar con un derivado de éster activo de un ligando seleccionado. Los expertos en la técnica conocen bien derivados de éster activo. Los ésteres activos representativos incluyen ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres tetrafluorofenólicos, ésteres pentafluorofenólicos y ésteres pentaclorofenólicos. La reacción del grupo amino y el éster activo produce un oligonucleótido en el que el ligando seleccionado se une a la posición 5' a través de un grupo de unión. El grupo amino en el extremo 5' terminal puede prepararse utilizando un reactivo C6 modificador de amino 5'. En una realización, pueden conjugarse moléculas de ligando con oligonucleótidos en la posición 5' mediante el uso de una fosforamidita de ligando-nucleósido en la que el ligando se une al grupo 5'-hidroxilo directa o indirectamente mediante un ligador. Tales fosforamiditas de ligando-nucleósido se usan normalmente al final de un procedimiento de síntesis automático para proporcionar un oligonucleótido conjugado con ligando que lleva el ligando en el extremo 5' terminal.

Los ejemplos de estructuras principales o enlaces internucleosídicos modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo incluyendo fosfonatos de 3'-alquilo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos de éstos unidos en 2'-5' y aquéllos que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos de 3'-5' a 5'-3' o de 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Patentes de EE.UU. representativas que se refieren a la preparación de los enlaces que contienen átomos de fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n.^{os} 3.687.808, 4.469.863, 4.476.301, 5.023.243, 5.177.196, 5.188.897, 5.264.423, 5.276.019, 5.278.302, 5.286.717, 5.321.131, 5.399.676, 5.405.939, 5.453.496, 5.455.233, 5.466.677, 5.476.925, 5.519.126, 5.536.821, 5.541.306, 5.550.111, 5.563.253, 5.571.799, 5.587.361, 5.625.050 y 5.697.248, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

Ejemplos de estructuras principales o enlaces internucleosídicos modificados que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos (es decir, oligonucleósidos) tienen estructuras principales que se forman mediante enlaces interazúcar de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces interazúcar de alquilo o cicloalquilo y heteroátomos mezclados, o uno o más enlaces interazúcar heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formacetilo y tioformacetilo; estructuras principales de metilenformacetilo y tioformacetilo; estructuras principales que contienen alqueno; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilenimino y metilenhidrazino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tienen partes de componentes de N, O, S, CH₂ mezclados.

Las patentes de EE.UU. representativas que se refieren a la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n.^{os} 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, 5.633.366, 5.677.437 y 5.677.439, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia.

- 5 En ciertos casos, el oligonucleótido puede modificarse mediante un grupo que no es un ligando. Se han conjugado varias moléculas que no son ligandos con oligonucleótidos con el fin de potenciar la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido, y procedimientos para realizar tales conjugaciones están disponibles en la bibliografía científica. Tales restos que no son ligandos han incluido restos lipídicos, tales como colesterol (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, Nucl. Acids Res., 1992, 20:533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J., 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, Biochimie, 1993, 75:49), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manolaran *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea *et al.*, Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969), o ácido adamantanacético (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651), un resto de palmitilo (Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1246:229), o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolessterol (Crooke *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923). Patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos se han enumerado anteriormente. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de oligonucleótidos que llevan un aminoligador en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar entonces con la molécula que está conjugándose usando reactivos de activación o acoplamiento apropiados. La reacción de conjugación puede realizarse o bien con el oligonucleótido todavía unido al soporte sólido o bien tras la escisión del oligonucleótido en fase de disolución. La purificación del conjugado de oligonucleótido mediante HPLC proporciona normalmente el conjugado puro. El uso de un conjugado de colesterol se prefiere particularmente puesto que un resto de este tipo puede aumentar el direccionamiento a células hepáticas, un sitio de expresión de PCSK9.

Agentes de iARN codificados por vectores

- 30 El ARNbc de la invención también puede expresarse a partir de vectores virales recombinantes de manera intracelular *in vivo*. Los vectores virales recombinantes de la invención comprenden secuencias que codifican para el ARNbc de la invención y cualquier promotor adecuado para expresar las secuencias de ARNbc. Los promotores adecuados incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras de ARN pol III U6 o H1 y el promotor de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia en la técnica. Los vectores virales recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión del ARNbc en un tejido particular o en un entorno intracelular particular. El uso de vectores virales recombinantes para administrar ARNbc de la invención a células *in vivo* se comenta en más detalle a continuación.

- 40 El ARNbc de la invención puede expresarse a partir de un vector viral recombinante o bien como dos moléculas de ARN separadas, complementarias, o bien como una única molécula de ARN con dos regiones complementarias.

- 45 Puede usarse cualquier vector viral que pueda aceptar las secuencias codificantes para la(s) molécula(s) de ARNbc que va(n) a expresar(se), por ejemplo vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociado (VAA); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), rabdovirus, virus de la leucemia murina); virus del herpes, y similares. El tropismo de los vectores virales puede modificarse mediante pseudotipado de los vectores con proteínas de la envuelta u otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de la cápsida viral, según sea apropiado.

- 50 Por ejemplo, pueden pseudotiparse vectores lentivirales de la invención con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VEV), rabia, Ebola, Mokola, y similares. Pueden prepararse vectores de VAA de la invención para seleccionar como diana diferentes células modificando mediante ingeniería genética los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de la cápsida. Por ejemplo, un vector de VAA que expresa una cápsida de serotipo 2 en un genoma de serotipo 2 se denomina VAA 2/2. Este gen de la cápsida de serotipo 2 en el vector VAA 2/2 puede reemplazarse por un gen de la cápsida de serotipo 5 para producir un vector VAA 2/5. Técnicas para construir vectores de VAA que expresan diferentes serotipos de proteínas de la cápsida están dentro de la experiencia en la técnica; véase, por ejemplo, Rabinowitz J. E. *et al.* (2002), J Virol 76:791-801, cuya descripción completa se incorpora en el presente documento como referencia.

- 60 La selección de vectores virales recombinantes adecuados para su uso en la invención, métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar el ARNbc en el vector, y métodos de administración del vector viral a las células de interés están dentro de la experiencia en la técnica. Véase, por ejemplo, Domburg R (1995); Gene Therap. 2: 301-310; Eglitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1:5-14; Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30; y Robinson D A *et al.*, Nat. Genet. 33: 401-406, cuya descripción completa se incorpora en el presente documento como referencia.

- 65 Vectores virales preferidos son los derivados de AV y VAA. En una realización particularmente preferida, el ARNbc

de la invención se expresa como dos moléculas de ARN monocatenario separadas, complementarias a partir de un vector de VAA recombinante que comprende, por ejemplo, o bien los promotores de ARN U6 o H1, o bien el promotor de citomegalovirus (CMV).

- 5 Un vector de AV adecuado para la expresión del ARNbc de la invención, un método para construir el vector de AV recombinante, y un método para administrar el vector al interior de las células diana se describen en Xia H *et al.* (2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010.

- 10 Vectores de VAA adecuados para expresar el ARNbc de la invención, métodos para construir el vector de AV recombinante, y métodos para administrar los vectores al interior de células diana se describen en Samulski R *et al.* (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J *et al.* (1996), J. Virol. 70: 520-523; Samulski R *et al.* (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; patente de EE.UU. n.º 5.252.479; patente de EE.UU. n.º 5.139.941; solicitud de patente internacional n.º WO 94/1388 y solicitud de patente internacional n.º WO 93/24641, cuyas descripciones completas se incorporan en el presente documento como referencia.

15 III. Composiciones farmacéuticas que comprenden ARNbc

- 20 En una realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un ARNbc, tal como se describe en el presente documento, y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que comprende el ARNbc es útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o actividad del gen PCSK9, tal como procesos patológicos que pueden mediarse por la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9, tales como hiperlipidemia. Tales composiciones farmacéuticas se formulan basándose en el modo de administración. Un ejemplo son composiciones que se formulan para su administración al hígado mediante administración parenteral.

- 25 Las composiciones farmacéuticas de la invención se administran en dosificaciones suficientes para inhibir la expresión del gen PCSK9. Los presentes inventores han encontrado que, debido a su eficacia mejorada, las composiciones que comprenden el ARNbc de la invención pueden administrarse a dosificaciones sorprendentemente bajas. Una dosificación de 5 mg de ARNbc por kilogramo de peso corporal del receptor al día es suficiente para inhibir o suprimir la expresión del gen PCSK9 y puede administrarse de manera sistémica al paciente.

- 30 En general, una dosis adecuada de ARNbc estará en el intervalo de 0,01 a 5,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor al día, generalmente en el intervalo de 1 microgramo a 1 mg por kilogramo de peso corporal al día. La composición farmacéutica puede administrarse una vez al día, o el ARNbc puede administrarse como dos, tres o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo de todo el día o incluso usando infusión continua o administración a través de una formulación de liberación controlada. En ese caso, el ARNbc contenido en cada subdosis debe ser correspondientemente más pequeño con el fin de lograr la dosificación diaria total. La unidad de dosificación también puede componerse para su administración a lo largo de varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona liberación sostenida del ARNbc a lo largo de un periodo de varios días. Se conocen bien en la técnica formulaciones de liberación sostenida.

- 35 El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y programación requeridas para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo pero sin limitarse a la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos. Pueden hacerse estimaciones de dosificaciones eficaces y semividas *in vivo* para los ARNbc individuales abarcados por la invención usando metodologías convencionales o basándose en pruebas *in vivo* usando un modelo animal apropiado, tal como se describe en otra parte en el presente documento.

- 40 50 Avances en la genética del ratón han generado varios modelos de ratón para el estudio de diversas enfermedades humanas, tales como procesos patológicos que pueden mediarse mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9. Tales modelos se usan para pruebas *in vivo* de ARNbc, así como para determinar una dosis terapéuticamente eficaz

- 55 Puede usarse cualquier método para administrar un ARNbc de la presente invención a un mamífero. Por ejemplo, la administración puede ser directa; oral; o parenteral (por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intraventricular, intramuscular o intraperitoneal, o mediante goteo intravenoso). La administración puede ser rápida (por ejemplo, mediante inyección), o puede producirse a lo largo de un periodo de tiempo (por ejemplo, mediante infusión lenta o administración de formulaciones de liberación lenta).

- 60 Normalmente, cuando se trata un mamífero con hiperlipidemia, las moléculas de ARNbc se administran de manera sistémica por medios parenterales. Pueden administrarse por vía intravenosa a un paciente, por ejemplo, ARNbc conjugados o no conjugados o formulados con o sin liposomas. Para ello, puede formularse una molécula de ARNbc en composiciones tales como disoluciones acuosas, disoluciones no acuosas estériles y no estériles en disolventes comunes tales como alcoholes, o disoluciones en bases de aceite líquidas o sólidas. Tales disoluciones pueden contener también tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Para administración parenteral, intratecal, o

intraventricular, puede formularse una molécula de ARNbc en composiciones tales como disoluciones acuosas estériles, que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados (por ejemplo, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores farmacéuticamente aceptables).

- 5 Además, pueden administrarse moléculas de ARNbc a un mamífero mediante medios biológicos o abiológicos tal como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.271.359. Puede lograrse la administración abiológica mediante una variedad de métodos incluyendo, sin limitación, (1) cargar liposomas con una molécula de ARNbc proporcionada en el presente documento y (2) complejar una molécula de ARNbc con lípidos o liposomas para formar complejos de ácido nucleico-lípido o ácido nucleico-liposoma. El liposoma puede estar compuesto por lípidos catiónicos y neutros comúnmente usados para transfectar células *in vitro*. Pueden complejarse lípidos catiónicos (por ejemplo, asociados a carga) con ácidos nucleicos cargados negativamente para formar liposomas. Los ejemplos de liposomas catiónicos incluyen, sin limitación, lipofectina, lipofectamina, lipofectace y DOTAP. Se conocen bien en la técnica procedimientos para formar liposomas. Pueden formarse composiciones de liposomas, por ejemplo, a partir de fosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilglicerol o dioleoilfosfatidiletanolamina. Están disponibles comercialmente numerosos agentes lipófilos, incluyendo Lipofectin.RTM. (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Calif) y Effectene.TM. (Qiagen, Valencia, Calif.). Además, pueden optimizarse los métodos de administración sistémica usando lípidos catiónicos disponibles comercialmente tales como DDAB o DOTAP, cada uno de los cuales puede mezclarse con un lípido neutro tal como DOPE o colesterol. En algunos casos, pueden usarse liposomas tales como los descritos por Templeton *et al.* (Nature Biotechnology, 15: 647-652 (1997)). En otras realizaciones, pueden usarse policationes tales como polietilimina para lograr la administración *in vivo* y *ex vivo* (Boletta *et al.*, J. Am Soc, Nephrol. 7: 1 1728 (1996)). Puede encontrarse información adicional referente al uso de liposomas para administrar ácidos nucleicos en la patente de EE.UU. n.º 6.271.359, publicación PCT WO 96/40964 y Morrissey, D. *et al.* 2005. Nat Biotechnol. 23(8):1002-7.
- 25 Puede lograrse la administración biológica mediante una variedad de métodos incluyendo, sin limitación, el uso de vectores virales. Por ejemplo, pueden usarse vectores virales (por ejemplo, vectores de adenovirus y virus del herpes) para administrar moléculas de ARNbc a células hepáticas. Pueden usarse técnicas de biología molecular convencionales para introducir uno o más de los ARNbc proporcionados en el presente documento en uno de los muchos vectores virales diferentes desarrollados para administrar ácido nucleico a células. Estos vectores virales resultantes pueden usarse para administrar el uno o más ARNbc a células mediante, por ejemplo, infección.

- Pueden formularse ARNbc de la presente invención en un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. Un "portador farmacéuticamente aceptable" (también denominado en el presente documento "excipiente") es un agente de suspensión, disolvente farmacéuticamente aceptable o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte.
- 35 Portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos, sólidos y pueden seleccionarse teniendo en cuenta la manera de administración planeada para proporcionar la consistencia, el volumen deseado y otras propiedades químicas y de transporte pertinentes. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo de ejemplo y no de limitación: agua; solución salina, agentes de unión (por ejemplo, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, gelatina o sulfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, almidón, polietilenglicol o acetato de sodio); disgregantes (por ejemplo, almidón o glicolato sódico de almidón); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio).

- Además, el ARNbc que selecciona como diana el gen PCSK9 puede formularse en composiciones que contienen el ARNbc mezclado, encapsulado, conjugado, o asociado de otra manera con otras moléculas, estructuras moleculares, o mezclas de ácidos nucleicos. Por ejemplo, una composición que contiene uno o más agentes de ARNbc que seleccionan como diana el gen PCSK9 pueden contener otros agentes terapéuticos tales como otros agentes hipolipemiantes (por ejemplo, estatinas).

50 Métodos para tratar enfermedades que pueden modularse mediante la regulación por disminución de la expresión de PCSK9

- Los métodos y las composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades y estados que pueden modularse mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse para tratar la hiperlipidemia y otras formas de desequilibrio de lípidos tales como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y los estados patológicos asociados con estos trastornos tales como enfermedades circulatorias y cardíacas.

Métodos para inhibir la expresión del gen PCSK9

- 60 También se describe un método para inhibir la expresión del gen PCSK9 en un mamífero. El método comprende administrar una composición de la invención al mamífero de manera que la expresión del gen PCSK9 diana se silencie. Debido a su alta especificidad, los ARNbc de la invención seleccionan como diana específicamente ARN (primarios o procesados) del gen PCSK9 diana. Pueden realizarse composiciones y métodos para inhibir la expresión de estos genes PCSK9 usando ARN tal como se describe en otra parte en el presente documento.

- 65 El método puede comprender administrar una composición que comprende un ARNbc, en el que el ARNbc

comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARN del gen PCSK9 del mamífero que va a tratarse. Cuando el organismo que va a tratarse es un mamífero tal como un ser humano, la composición puede administrarse mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a vías orales o parenterales, incluyendo administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, a las vías respiratorias (aerosol). En realizaciones preferidas, las composiciones se administran mediante inyección o infusión intravenosa.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica y las pruebas de la invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Ejemplos

Paseo génico del gen PCSK9

Se llevó a cabo el diseño de ARNic para identificar en dos selecciones separadas

- a) ARNic que seleccionan como diana ARNm de PCSK9 o bien de ratón o bien de rata y humano, y
- b) todos los ARNic reactivos humanos con especificidad pronosticada con el gen diana PCSK9.

Se usaron secuencias de ARNm para PCSK9 de ser humano, ratón y rata: Se usó la secuencia humana NM_174936.2 como secuencia de referencia durante el procedimiento de selección de ARNic completo.

Se identificaron tramos de 19 meros conservados en ser humano y ratón, y secuencias de ARNm de PCSK9 de ser humano y rata en la primera etapa, dando como resultado la selección de ARNic que reaccionan de manera cruzada con dianas de ser humano y ratón, y ARNic que reaccionan de manera cruzada con dianas de ser humano y rata

Se identificaron en una segunda selección de ARNic que seleccionan como diana específicamente PCSK9 humano. Se extrajeron todas las posibles secuencias de 19 meros de PCSK9 humano y se definieron como secuencias diana candidatas. Se enumeran todas las secuencias que reaccionan de manera cruzada con ser humano, mono y las que reaccionan de manera cruzada con ratón, rata, ser humano y mono en las tablas 1 y 2. También se enumeran versiones químicamente modificadas de esas secuencias y su actividad en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* en las tablas 1 y 2 y los ejemplos facilitados en las figuras 2-8.

Con el fin de clasificar secuencias diana candidatas y sus ARNic correspondientes y seleccionar las apropiadas, se tomó su potencial pronosticado para interaccionar con dianas irrelevantes (potencial inespecífico) como parámetro de clasificación. Se definieron ARNic con potencial inespecífico bajo como preferibles y se supuso que eran más específicos *in vivo*.

Para pronosticar el potencial inespecífico específico de ARNic, se hicieron las siguientes suposiciones:

- 1) las posiciones 2 a 9 (contando de 5' a 3') de una hebra (región semilla) pueden contribuir más al potencial inespecífico que el resto de la secuencia (región de sitio de escisión y no semilla)

- 2) las posiciones 10 y 11 (contando de 5' a 3') de una hebra (región de sitio de escisión) pueden contribuir más al potencial inespecífico que la región no semilla

- 3) las posiciones 1 y 19 de cada hebra no son relevantes para las interacciones inespecíficas

- 4) puede calcularse una puntuación inespecífica para cada gen y cada hebra, basándose en la complementariedad de la secuencia de la hebra de ARNic en la secuencia del gen y la posición de apareamientos erróneos

- 5) deben considerarse el número de efectos inespecíficos pronosticados así como la puntuación inespecífica más alta para determinar el potencial inespecífico

- 6) las puntuaciones inespecíficas deben considerarse más relevantes para el potencial inespecífico que los números de efectos inespecíficos

- 7) suponiendo una posible supresión de la actividad de la hebra sentido por las modificaciones internas introducidas, sólo será relevante el potencial inespecífico de la hebra antisentido.

Para identificar posibles genes inespecíficos, se sometieron secuencias candidatas de 19 meros a una búsqueda de homología frente a secuencias de ARNm humanas públicamente disponibles.

Se extrajeron las siguientes propiedades inespecíficas para cada secuencia de entrada de 19 meros para cada gen inespecífico para calcular la puntuación inespecífica:

5 Número de apareamientos erróneos en la región no semilla

Número de apareamientos erróneos en la región semilla

Número de apareamientos erróneos en la región de sitio de escisión

10

Se calculó la puntuación inespecífica considerando las suposiciones 1 a 3 tal como sigue:

Puntuación inespecífica = número de apareamientos erróneos semilla * 10

15 + número de apareamientos erróneos del sitio de escisión * 1,2

+ número de apareamientos erróneos no semilla * 1

20 Se definió el gen inespecífico más relevante para cada ARNic correspondiente a la secuencia de 19 meros de entrada como el gen con la menor puntuación inespecífica. Por consiguiente, se definió la menor puntuación inespecífica como la puntuación inespecífica relevante para cada ARNic.

Síntesis de ARNbc

25 Fuente de reactivos

Cuando la fuente de un reactivo no se facilita específicamente en el presente documento, tal reactivo puede obtenerse de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular con una calidad/pureza convencional para su aplicación en biología molecular.

30

Síntesis de ARNic

35 Se produjeron ARN monocatenarios mediante síntesis en fase sólida en una escala de 1 µmol usando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemania) y vidrio de poro controlado (CPG, 500 Å, Proligo Biochemic GmbH, Hamburgo, Alemania) como soporte sólido. Se generaron ARN y ARN que contenía nucleótidos de 2'-O-metilo mediante síntesis en fase sólida empleando las correspondientes fosoramiditas y fosoramiditas de 2'-O-metilo, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania). Se incorporaron estos elementos estructurales en sitios seleccionados dentro de la secuencia de la cadena oligorribonucleotídica usando química de fosoramidita de nucleósidos convencional tal como se describe en Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. *et al*, (Edrs), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.

40

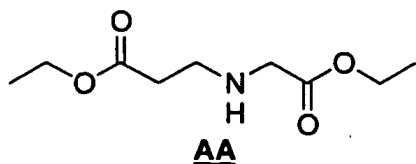
Se introdujeron enlaces de fosforotioato mediante el reemplazamiento de la disolución de oxidante de yodo por una disolución del reactivo de Beaucage (Cruachem Ltd, Glasgow, GB) en acetonitrilo (1%). Se obtuvieron reactivos auxiliares adicionales de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemania).

45 Se llevó a cabo la desprotección y purificación de los oligorribonucleótidos brutos mediante HPLC de intercambio aniónico según procedimientos establecidos. Se determinaron los rendimientos y las concentraciones mediante la absorción de UV de una disolución del ARN respectivo a una longitud de onda de 260 nm usando un fotómetro espectral (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, Alemania). Se generó ARN bicatenario mezclando una disolución equimolar de hebras complementarias en tampón de apareamiento (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8; cloruro de sodio 100 mM), se calentó en un baño de agua a 85 – 90°C durante 3 minutos y se enfrió hasta temperatura ambiente a lo largo de un periodo de 3 - 4 horas. Se almacenó la disolución de ARN apareado a -20°C hasta su uso.

50

55 Para la síntesis de ARNic conjugados con colesterol en 3' (denominados en el presente documento -Col-3'), se usó un soporte sólido apropiadamente modificado para la síntesis de ARN. Se preparó el soporte sólido modificado tal como sigue:

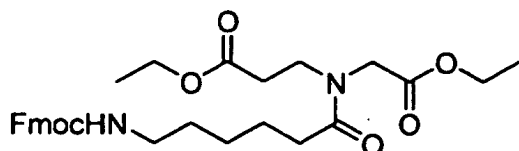
Dietil-2-azabutano-1,4-dicarboxilato AA



60

Se añadió una disolución acuosa 4,7 M de hidróxido de sodio (50 ml) en una disolución enfriada con hielo, con agitación de clorhidrato de glicinato de etilo (32,19 g, 0,23 mol) en agua (50 ml). Entonces, se añadió acrilato de etilo (23,1 g, 0,23 mol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente hasta que se determinó el final de la reacción mediante CCF. Tras 19 h, se repartió la disolución con diclorometano (3 x 100 ml). Se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó. Se destiló el residuo produciendo AA (28,8 g, 61%).

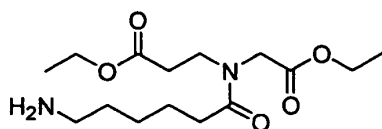
Éster etílico del ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propiónico AB



AB

Se disolvió ácido Fmoc-6-amino-hexanoico (9,12 g, 25,83 mmol) en diclorometano (50 ml) y se enfrió con hielo. Se añadió diisopropilcarbodiimida (3,25 g, 3,99 ml, 25,83 mmol) a la disolución a 0°C. Entonces a esto le siguió la adición de dietil-azabutano-1,4-dicarboxilato (5 g, 24,6 mmol) y dimetilaminopiridina (0,305 g, 2,5 mmol). Se llevó la disolución a temperatura ambiente y se agitó adicionalmente durante 6 h. Se determinó la finalización de la reacción mediante CCF. Se concentró la mezcla de reacción a vacío y se añadió acetato de etilo para precipitar la diisopropilurea. Se filtró la suspensión. Se lavó el filtrado con ácido clorhídrico acuoso al 5%, bicarbonato de sodio al 5% y agua. Se secó la fase orgánica combinada sobre sulfato de sodio y se concentró proporcionando el producto bruto que se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc al 50%/hexano) produciendo 11,87 g (88%) de AB.

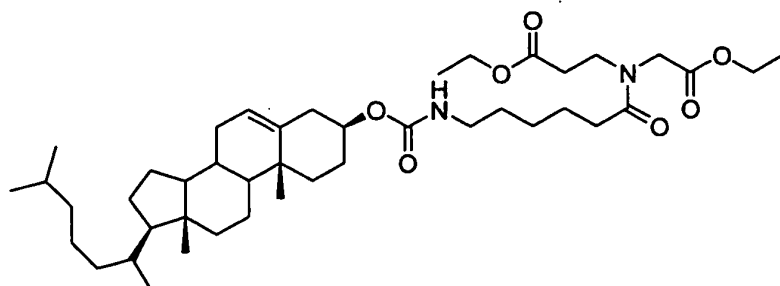
Éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico AC



AC

Se disolvió éster etílico del ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-hexanoil]-amino}-propiónico AB (11,5 g, 21,3 mmol) en piperidina al 20% en dimetilformamida a 0°C. Se continuó agitando la disolución durante 1 h. Se concentró la mezcla de reacción a vacío, se añadió agua al residuo y se extrajo el producto con acetato de etilo. Se purificó el producto bruto mediante conversión en su sal de clorhidrato.

Éster etílico del ácido 3-[(6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil)etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico AD

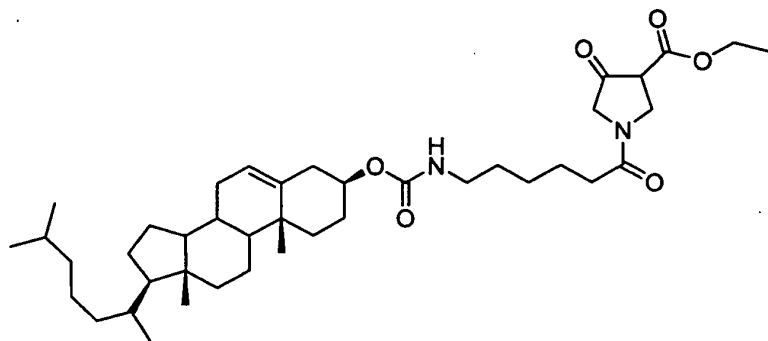


AD

Se llevó la sal de clorhidrato del éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico AC (4,7 g, 14,8 mmol) a diclorometano. Se enfrió la suspensión hasta 0°C sobre hielo. A la suspensión se le añadió diisopropiletilamina (3,87 g, 5,2 ml, 30 mmol). A la disolución resultante se le añadió cloroformiato de colesterilo (6,675 g, 14,8 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Se diluyó la mezcla de reacción con

diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico al 10%. Se purificó el producto mediante cromatografía ultrarrápida (10,3 g, 92%).

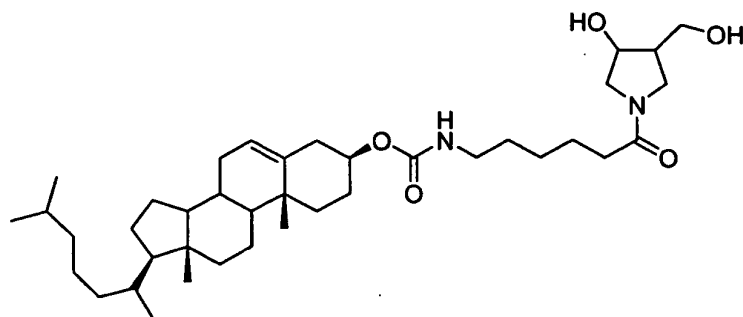
5 Éster etílico del ácido 1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo]xycarbonilamino]-hexanoil}-4-oxo-pirrolidin-3-carboxílico AE



AE

10 Se suspendió t-butoxido de potasio (1,1 g, 9,8 mmol) en 30 ml de tolueno seco. Se enfrió la mezcla hasta 0°C sobre hielo y se añadieron lentamente 5 g (6,6 mmol) de diéster AD con agitación en el plazo de 20 min. Se mantuvo la temperatura por debajo de 5°C durante la adición. Se continuó la agitación durante 30 min. a 0°C y se añadió 1 ml de ácido acético glacial, seguido inmediatamente por 4 g de NaH₂PO₄·H₂O en 40 ml de agua. Se extrajo dos veces la mezcla resultante con 100 ml de diclorometano cada una y se lavaron dos veces los extractos orgánicos combinados con 10 ml de tampón fosfato cada una, se secaron y se evaporaron hasta sequedad. Se disolvió el residuo en 60 ml de tolueno, se enfrió hasta 0°C y se extrajo con tres porciones de 50 ml de tampón carbonato a pH 9,5 frío. Se ajustaron los extractos acuosos hasta pH 3 con ácido fosfórico, y se extrajeron con cinco porciones de 40 ml de cloroformo que se combinaron, se secaron y se evaporaron hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en columna usando acetato de etilo al 25%/hexano produciendo 1,9 g de b-cetoéster (39%).

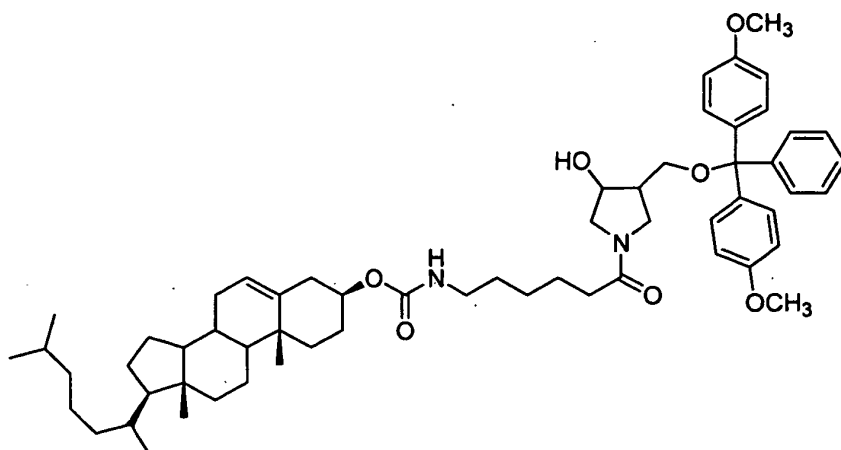
20 Éster 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido [6-(3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]-carbámico AF



AF

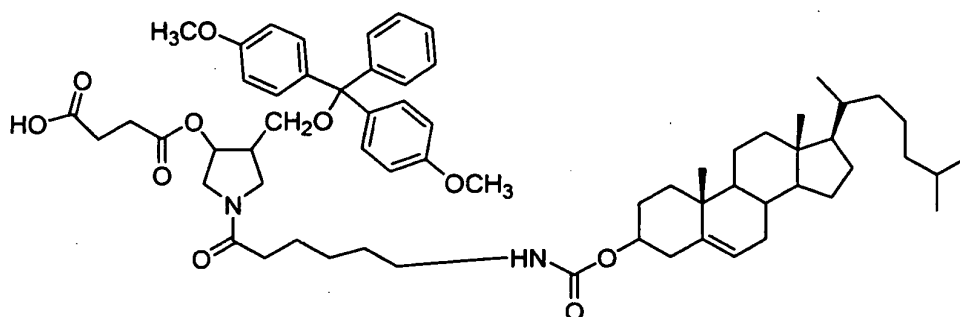
25 Se añadió gota a gota metanol (2 ml) a lo largo de un periodo de 1 h a una mezcla a reflujo de b-cetoéster AE (1,5 g, 2,2 mmol) y borohidruro de sodio (0,226 g, 6 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml). Se continuó la agitación a temperatura de reflujo durante 1 h. Tras enfriar hasta temperatura ambiente, se añadió HCl 1 N (12,5 ml), se extrajo la mezcla con acetato de etilo (3 x 40 ml). Se secó la fase de acetato de etilo combinada sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a vacío produciendo el producto que se purificó mediante cromatografía en columna (MeOH al 10%/CHCl₃) (89%).

35 Éster 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido (6-{3-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidroxi-pirrolidin-1-il}-6-oxo-hexil)-carbámico AG

**AG**

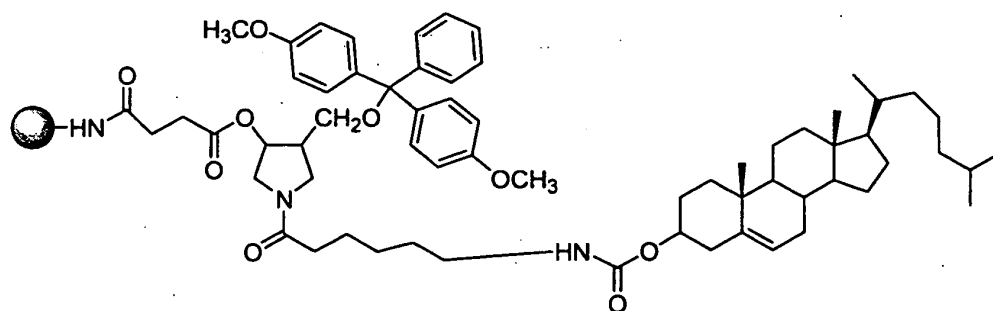
Se secó diol AF (1,25 g 1,994 mmol) evaporando con piridina (2 x 5 ml) a vacío. Se añadieron piridina anhidra (10 ml) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,724 g, 2,13 mmol) con agitación. Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se extinguió la reacción mediante la adición de metanol. Se concentró la mezcla de reacción a vacío y al residuo se le añadió diclorometano (50 ml). Se lavó la fase orgánica con bicarbonato de sodio acuoso 1 M. Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. Se eliminó la piridina residual evaporando con tolueno. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna (MeOH al 2%/cloroformo, R_f = 0,5 en MeOH al 5%/CHCl₃) (1,75 g, 95%).

Éster mono-(4-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo]carbonilamino]hexanoil}-pirrolidin-3-ílico) del ácido succínico AH

**AH**

Se mezcló el compuesto AG (1,0 g, 1,05 mmol) con anhídrido succínico (0,150 g, 1,5 mmol) y DMAP (0,073 g, 0,6 mmol) y se secó a vacío a 40°C durante la noche. Se disolvió la mezcla en dicloroetano anhidro (3 ml), se añadió trietilamina (0,318 g, 0,440 ml, 3,15 mmol) y se agitó la disolución a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 16 h. Entonces se diluyó con diclorometano (40 ml) y se lavó con ácido cítrico acuoso enfriado con hielo (al 5% en peso, 30 ml) y agua (2 X 20 ml). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró hasta sequedad. Se usó el residuo como tal para la siguiente etapa.

CPG derivatizado con colesterol AI

**AI**

Se disolvió succinato AH (0,254 g, 0,242 mmol) en una mezcla de diclorometano/acetonitrilo (3:2, 3 ml). A esa disolución se le añadieron sucesivamente DMAP (0,0296 g, 0,242 mmol) en acetonitrilo (1,25 ml), 2,2'-ditio-bis(5-nitropiridina) (0,075 g, 0,242 mmol) en acetonitrilo/dicloroetano (3:1, 1,25 ml). A la disolución resultante se le añadió trifenilfosfina (0,064 g, 0,242 mmol) en acetonitrilo (0,6 ml). La mezcla de reacción se volvió de color naranja brillante. Se agitó brevemente la disolución usando un agitador con movimiento de muñeca (5 min.). Se añadió alquilamina de cadena larga-CPG (LCAA-CPG) (1,5 g, 61 mM). Se agitó la suspensión durante 2 h. Se filtró el CPG a través de un embudo sinterizado y se lavó con acetonitrilo, diclorometano y éter sucesivamente. Se enmascararon los grupos amino sin reaccionar usando anhídrido acético/piridina. Se midió la carga lograda del CPG tomando la medición de UV (37 mM/g).

Se realizó la síntesis de ARNic que portan un grupo bisdecilamida del ácido 5'-12-dodecanoico (en el presente documento denominado "5'-C32-") o un grupo derivado de 5'-colesterilo (en el presente documento denominado "5'-Col-") tal como se describe en el documento WO 2004/065601, excepto porque, para el derivado de colesterilo, se realizó la etapa de oxidación usando el reactivo de Beaucage con el fin de introducir un enlace fosforotioato en el extremo 5' del oligómero de ácido nucleico.

Se representan a continuación secuencias de ácido nucleico usando nomenclatura convencional, y específicamente las abreviaturas de la tabla 1-2.

Tabla 1-2: Abreviaturas de monómeros de nucleótidos usadas en la representación de secuencias de ácido nucleico. Debe entenderse que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están unidos mutuamente por enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviatura ^a	Nucleótido(s)
A, a	2'-desoxi-adenosin-5'-fosfato, adenosin-5'-fosfato
C, c	2'-desoxi-citidin-5'-fosfato, citidin-5'-fosfato
G, g	2'-desoxi-guanosin-5'-fosfato, guanosin-5'-fosfato
T, t	2'-desoxi-timidin-5'-fosfato, timidin-5'-fosfato
U, u	2'-desoxi-uridin-5'-fosfato, uridin-5'-fosfato
N, n	cualquier 2'-desoxi-nucleótido/nucleótido (G, A, C, o T, g, a, c o u)
Am	2'-O-metiladenosin-5'-fosfato
Cm	2'-O-metilcitidin-5'-fosfato
Gm	2'-O-metilguanosin-5'-fosfato
Tm	2'-O-metil-timidin-5'-fosfato
Um	2'-O-metiluridin-5'-fosfato
Af	2'-fluoro-2'-desoxi-adenosin-5'-fosfato
Cf	2'-fluoro-2'-desoxi-citidin-5'-fosfato
Gf	2'-fluoro-2'-desoxi-guanosin-5'-fosfato
Tf	2'-fluoro-2'-desoxi-timidin-5'-fosfato
Uf	2'-fluoro-2'-desoxi-uridin-5'-fosfato

A, C, G, T, U, a, c, g, t, u	subrayado; nucleósido-5'-fosforotioato
am, cm, gm, tm, um	subrayado: 2'-O-metil-nucleósido-5'-fosforotioato

^aletras mayúsculas representan 2'-desoxirribonucleótidos (ADN), letras minúsculas representan ribonucleótidos (ARN)

La selección de ARNic de PCSK9 en HuH7, HepG2, Hela y hepatocitos de mono primarios descubre secuencias altamente activas

Se obtuvieron células HuH-7 del banco de células de la JCRB ("Japanese Collection of Research Bioresources") (Shinjuku, Japón, n.º de cat.: JCRB0403). Se cultivaron células en MEM de Dulbecco (Biochrom AG, Berlín, Alemania, n.º de cat. F0435) complementado para contener un 10% de suero de ternero fetal (FCS) (Biochrom AG, Berlín, Alemania, n.º de cat. S0115), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml (Biochrom AG, Berlín, Alemania, n.º de cat. A2213) y L-glutamina 2 mM (Biochrom AG, Berlín, Alemania, n.º de cat. K0282) a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂ en una incubadora humidificada (Heraeus HERAccl, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Alemania). Se obtuvieron células HepG2 y Hela de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD, n.º de cat. HB-8065) y se cultivaron en MEM (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, n.º de cat. 21090-022) complementado para contener un 10% de suero de ternero fetal (FCS) (Biochrom AG, Berlín, Alemania, n.º de cat. S0115), penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml (Biochrom AG, Berlín, Alemania, n.º de cat. A2213), aminoácidos no esenciales 1x (Biochrom AG, Berlín, Alemania, n.º de cat. K-0293) y piruvato de sodio 1 mM (Biochrom AG, Berlín, Alemania, n.º de cat. L-0473) a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂ en una incubadora humidificada (Heraeus HERAccl, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Alemania).

Para la transfección con ARNic, se sembraron células HuH7, HepG2 o Hela a una densidad de $2,0 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos y se transfectaron directamente. Se llevó a cabo la transfección de ARNic (30 nM para la selección de dosis única) con lipofectamine 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania, n.º de cat. 11668-019) tal como se describe por el fabricante.

24 horas tras la transfección, se lisaron las células HuH7 y HepG2 y se cuantificaron los niveles de ARNm de PCSK9 con el kit Quantigene Explore (Genospectra, Dumbarton Circle Fremont, EE.UU., n.º de cat. QG-000-02) según el protocolo. Se normalizaron los niveles de ARNm de PCSK9 con respecto a ARNm de GAP-DH. Para cada ARNic se recogieron los ocho puntos de datos individuales. Se usaron dúplex de ARNic no relacionados con el gen PCSK9 como control. Se expresó la actividad de un dúplex de ARNic específico para PCSK9 dado como el porcentaje de concentración de ARNm de PCSK9 en células tratadas con respecto a concentración de ARNm de PCSK9 en células tratadas con el dúplex de ARNic control.

Se obtuvieron hepatocitos de mono Cynomolgus primarios (crioconservados) de *In vitro* Technologies, Inc. (Baltimore, Maryland, EE.UU., n.º de cat. M00305) y se cultivaron en medio *In vitro*GRO CP (n.º de cat. Z99029) a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.

Para la transfección con ARNic, se sembraron células de mono Cynomolgus primarias sobre placas recubiertas con colágeno (Fisher Scientific, n.º de cat. 08-774-5) a una densidad de $3,5 \times 10^4$ células/pocillo en placas de 96 pocillos y se transfectaron directamente. Se llevó a cabo la transfección de ARNic (ocho series de dilución de dos veces partiendo de 30 nM) por duplicado con lipofectamine 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania, n.º de cat. 11668-019) tal como se describe por el fabricante.

16 horas tras la transfección, se cambió el medio por medio *In vitro*GRO CP nuevo con mezcla de antibióticos Torpedo (*In vitro* Technologies, Inc, n.º de cat. Z99000) añadida.

24 horas tras el cambio del medio, se lisaron las células de mono Cynomolgus primarias y se cuantificaron los niveles de ARNm de PCSK9 con el kit Quantigene Explore (Genospectra, Dumbarton Circle Fremont, EE.UU., n.º de cat. QG-000-02) según el protocolo. Se normalizaron los niveles de ARNm de PCSK9 con respecto a ARNm de GAPDH. Entonces se compararon las razones de PCSK9/GAPDH normalizadas con la razón de PCSK9/GAPDH de lipofectamine 2000 sólo control.

Las tablas 1-2 (y la figura 6) resumen los resultados y proporcionan ejemplos de exámenes *in vitro* en diferentes líneas celulares a diferentes dosis. Se expresó el silenciamiento del transcrito de PCSK9 como el porcentaje de transcrito restante a una dosis dada. Secuencias altamente activas son aquellas con menos del 70% de transcrito restante tras el tratamiento con un ARNic dado a una dosis inferior o igual a 100 nM. Secuencias muy activas son aquellas que tienen menos del 60% de transcrito restante tras el tratamiento con una dosis inferior o igual a 100 nM. Secuencias activas son aquellas que tienen menos del 85% de transcrito restante tras el tratamiento con una dosis alta (100 nM). También se seleccionaron ejemplos de ARNic activos *in vivo* en ratón en formulaciones de lipídicos tal como se describe a continuación. Las secuencias activas *in vitro* también eran generalmente activas *in vivo* (véase la figura 6 por ejemplo).

Examen de eficacia *in vivo* de ARNic de PCSK9

Procedimiento de formulación

Se usaron el lipidoide LNP-01-4HCl (PM 1487) (figura 1), colesterol (Sigma-Aldrich) y PEG-ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) para preparar nanopartículas de lípido-ARNic. Se prepararon disoluciones madre de cada uno en etanol: LNP-01, 133 mg/ml; colesterol, 25 mg/ml, PEG-ceramida C16, 100 mg/ml. Entonces se combinaron las disoluciones madre de LNP-01, colesterol y PBG-ceramida C16 en una razón molar de 42:48:10. Se mezcló rápidamente la disolución de lípidos combinada con ARNic acuoso (en acetato de sodio pH 5) de manera que la concentración en etanol final era del 35-45% y la concentración en acetato de sodio final era de 100-300 mM. Se formaron nanopartículas de lípido-ARNic espontáneamente tras el mezclado. Dependiendo de la distribución de tamaño de partícula deseada, se extruyó la mezcla de nanopartículas resultante en algunos casos a través de una membrana de policarbonato (100 nm de corte) usando una prensa extrusora de termobarril (Lipex Extruder, Northern Lipids, Inc). En otros casos, se omitió la etapa de extrusión. Se logró la eliminación del etanol y el intercambio de tampón simultáneo mediante o bien diálisis o bien filtración de flujo tangencial. Se intercambió el tapón por solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,2.

Caracterización de formulaciones

Las formulaciones preparadas mediante el método o bien convencional o bien libre de extrusión se caracterizan de una manera similar. En primer lugar, se caracterizan las formulaciones mediante inspección visual. Deben ser disoluciones translúcidas blanquecinas libres de agregados o sedimento. Se miden el tamaño de partícula y la distribución de tamaño de partícula de nanopartículas de lípidos mediante dispersión de luz dinámica usando un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, EE.UU.). Las partículas deben tener 20-300 nm, e idealmente, 40-100 nm de tamaño. La distribución del tamaño de partícula debe ser unimodal. La concentración de ARNic total en la formulación, así como la fracción atrapada, se estima usando un ensayo de exclusión de tinte. Se incubaba una muestra del ARNic formulado con el tinte de unión a ARN Ribogreen (Molecular Probes) en presencia o ausencia de un tensioactivo que altera la formulación, Triton-X100 al 0,5%. Se determina el ARNic total en la formulación mediante la señal de la muestra que contiene el tensioactivo, en relación con una curva patrón. Se determina la fracción atrapada restando el contenido en ARNic "libre" (tal como se mide mediante la señal en la ausencia de tensioactivo) del contenido en ARNic total. El porcentaje de ARNic atrapado es normalmente >85%.

Dosificación en bolo

Se realizó la dosificación en bolo de ARNic formulados en ratones C57/BL6 (5/grupo, 8-10 semanas de edad, Charles River Laboratories, MA) mediante inyección en la vena de la cola usando una aguja 27G. Se formularon los ARNic en LNP-10 (y entonces se dializaron contra PBS) a una concentración de 0,5 mg/ml permitiendo la administración de la dosis de 5 mg/kg en 10 μ l/g de peso corporal. Se mantuvieron los ratones bajo una lámpara infrarroja durante aproximadamente 3 min. antes de la dosificación para facilitar la inyección.

48 horas tras la dosificación, se sacrificaron los ratones mediante asfixia con CO₂. Se recogieron 0,2 ml de sangre mediante hemorragia retroorbital y se extrajo el hígado y se congeló en nitrógeno líquido. Se almacenaron el suero y los hígados a -80°C.

Se trituraron los hígados congelados usando un triturador criogénico 6850 Freezer/Mill (SPEX CentriPrep, Inc) y se almacenaron los polvos a -80°C hasta el análisis.

Se detectaron los niveles de ARNm de PCSK9 usando el kit basado en tecnología de ADN ramificado del sistema de reactivos QuantiGene (Genospectra) según el protocolo. Se lisaron 10-20 mg de polvos de hígado congelado en 600 μ l de proteinasa K 0,16 μ g/ml (Epicentre, n.º MPRK092) en disolución de lisis celular y tisular (Epicentre, n.º MTC096H) a 65°C durante 3 horas. Entonces se añadieron 10 μ l de los lisados a 90 μ l de reactivo de trabajo de lisis (1 volumen o mezcla de lisis madre en dos volúmenes de agua) y se incubaron a 52°C durante la noche sobre placas de captura Genospectra con conjuntos de sondas específicas para PCSK9 de ratón y GAPDH de ratón o ciclofilina B. Se seleccionaron secuencias de ácido nucleico para las sondas de extensor de captura (CE), extensor de marcador (LE) y bloqueante (BL) a partir de las secuencias de ácido nucleico de PCSK9, GAPDH y ciclofilina B con la ayuda del software QuantiGene ProbeDesigner 2.0 (Genospectra, Fremont, CA, EE.UU., n.º de cat. QG-002-02). Se leyó la quimioluminiscencia en un instrumento Victor2-Light (Perkin Elmer) como unidades de luz relativas. Se calculó el promedio de la razón de ARNm de PCSK9 con respecto a ARNm de GAPDH o de ciclofilina B en lisados de hígado en cada grupo de tratamiento y se comparó con un grupo control tratado con PBS o un grupo control tratado con un ARNic no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea).

Se midió el colesterol sérico total en suero de ratón usando el kit StanBio Cholesterol LiquiColor (StanBio Laboratory, Boerne, Texas, EE.UU.) según instrucciones del fabricante. Se tomaron las mediciones en un contador multimarcador Victor2 1420 (Perkin Elmer) a 495 nm.

Ejemplos

Se sometieron a prueba 32 ARN_{ic} de PCSK9 formulados en liposomas de LNP-01 *in vivo* en un modelo de ratón. Se realizó el experimento a una dosis de ARN_{ic} de 5 mg/kg y al menos 10 ARN_{ic} de PCSK9 mostraron más del 40% de inactivación de ARN_m de PCSK9 en comparación con un grupo control tratado con PBS, mientras que el grupo control tratado con un ARN_{ic} no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea) no tuvo ningún efecto (figuras 2-5). El silenciamiento del transcrito de PCSK9 también se correlacionaba con una reducción del colesterol en estos animales (figuras 4-5). Además, había una fuerte correlación entre las moléculas que eran activas *in vitro* y las activas *in vivo* (figura 6). También se seleccionaron secuencias que contenían diferentes modificaciones químicas *in vitro* (tablas 1 y 2) e *in vivo*. Como ejemplo, se sometieron a prueba las secuencias menos modificadas 9314 y 9318, y versiones más modificadas de esta secuencia 9314-(10792,10793 y 10796); 9318-(10794,10795, 10797) tanto *in vitro* (en hepatocitos de mono primarios) como *in vivo* (9314 y 10792) formuladas en LNP-01. La figura 7 (véanse también las tablas 1 y 2) muestra que las moléculas originales 9314 y 9318 y las versiones modificadas son todas activas *in vitro*. La figura 8 como ejemplo muestra que tanto las secuencias originales 9314 como las más altamente modificadas 10792 son activas *in vivo* presentando un 50-60% de silenciamiento de PCSK9 endógeno en ratones. La figura 9 muestra adicionalmente a modo de ejemplo la actividad de otras versiones químicamente modificadas de las originales 9314 y 10792.

Vectores de expresión de ARN_{bc}

En otro aspecto de la invención, se expresan moléculas de ARN_{bc} específicas para PCSK9 que modulan la actividad de expresión del gen PCSK9 a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A., *et al.*, TTG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., *et al.*, publicación PCT internacional n.º WO 00/22113, Conrad, publicación PCT internacional n.º WO 00/22114, y Conrad, patente de EE.UU. n.º 6.054.299). Estos transgenes pueden introducirse como un constructo lineal, un plásmido circular o un vector viral, que puede incorporarse y heredarse como un transgén integrado en el genoma del huésped. El transgén también puede construirse para permitir que se herede como un plásmido extracromosómico (Gassmann, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1995) 92:1292).

Las hebras individuales de un ARN_{bc} pueden transcribirse mediante promotores en dos vectores de expresión separados y transferirse conjuntamente en una célula diana. Alternativamente, cada hebra individual del ARN_{bc} puede transcribirse mediante promotores, ambos de los cuales se ubican en el mismo plásmido de expresión. En una realización preferida, se expresa un ARN_{bc} como una repetición invertida unida por una secuencia de polinucleótido ligadora de manera que el ARN_{bc} tiene una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de ARN_{bc} recombinantes son generalmente plásmidos de ADN o vectores virales. Pueden construirse vectores virales que expresan ARN_{bc} basándose en, pero sin limitarse a, virus adenoasociados (para una revisión, véase Muzyczka, *et al.*, Curr. Topics Micro. Immunol. (1992) 158:97-129); adenovirus (véase, por ejemplo, Berkner, *et al.*, BioTechniques (1998) 6:616), Rosenfeld *et al.* (1991, Science 252:431-434), y Rosenfeld *et al.* (1992), Cell 68:143-155); o alfavirus así como otros conocidos en la técnica. Se han usado retrovirus para introducir una variedad de genes en muchos diferentes tipos de células, incluyendo células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, por ejemplo, Eglitis, *et al.*, Science (1985) 230:1395-1398; Danos y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85:6460-6464; Wilson *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018, Armentano *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:61416145; Huber *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry *et al.*, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury *et al.*, 1991, Science 254:1802-1805; van Beusechem, *et al.*, 1992, Proc. Nad. Acad. Sci. USA 89:7640-19; Kay *et al.*, 1992, Human Gene Therapy 3:641-647; Dai *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu *et al.*, 1993, J. Immunol. 150:4104-4115; patente de EE.UU. n.º 4.868.116; patente de EE.UU. n.º 4.980.286; solicitud PCT WO 89/071 36; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573). Pueden producirse vectores retrovirales recombinantes que pueden transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula transfectando el genoma retroviral recombinante en líneas celulares de empaquetamiento adecuadas tales como PA317 y Psi-CRIP (Comette *et al.*, 1991, Human Gene Therapy 2:5-10; Cone *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349). Pueden usarse vectores adenovirales recombinantes para infectar una amplia variedad de células y tejidos en huéspedes susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro y chimpancé) (Hsu *et al.*, 1992, J. Infectious Disease, 166:769), y también tienen la ventaja de no requerir células mitóticamente activas para la infección.

El promotor que dirige la expresión de ARN_{bc} en o bien un plásmido de ADN o bien un vector viral de la invención puede ser una ARN polimerasa I eucariota (por ejemplo promotor de ARN ribosómico); ARN polimerasa II (por ejemplo promotor temprano de CMV o promotor de actina o promotor de ARN_{np} de UI) o generalmente el promotor de ARN polimerasa III (por ejemplo promotor de ARN_{np} de U6 o ARN de 7SK) o un promotor procariota, por ejemplo el promotor de T7, siempre que el plásmido de expresión también codifique para polimerasa de ARN de T7 requerida para la transcripción de un promotor de T7. El promotor también puede dirigir la expresión transgénica en el páncreas (véase, por ejemplo la secuencia reguladora de insulina para el páncreas (Bucchini *et al.*, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515)).

Además, la expresión del transgén puede regularse de manera precisa, por ejemplo, usando una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tales como una secuencia reguladora que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa circulante, u hormonas (Docherty *et al.*, 1994, FASEB J.

8:20-24). Tales sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión transgénica en células o en mamíferos, incluyen regulación por ecdisona, por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosido (EPTG). Un experto en la técnica podría elegir la secuencia reguladora/promotora apropiada basándose en el uso previsto del transgén de ARNbc.

5 Generalmente, se administran vectores recombinantes que pueden expresar moléculas de ARNbc tal como se describe a continuación, y persisten en células diana. Alternativamente, pueden usarse vectores virales que proporcionan la expresión transitoria de moléculas de ARNbc. Tales vectores pueden administrarse repetidamente según sea necesario. Una vez expresados, los ARNbc se unen al ARN diana y modulan su función o expresión. La
10 administración de vectores que expresan ARNbc puede ser sistémica, tal como mediante administración intravenosa o intramuscular, mediante administración a células diana explantadas del paciente seguido por reintroducción en el paciente, o mediante cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.

15 Normalmente, se transfectan plásmidos de ADN de expresión de ARNbc en células diana como un complejo con portadores de lípidos catiónicos (por ejemplo oligofectamina) o portadores a base de lípidos no catiónicos (por ejemplo Transit-TKOTM). La invención también contempla transfecciones de lípidos múltiples para inactivaciones mediadas por ARNbc que seleccionan como diana diferentes regiones de un gen PCSK9 individual o múltiples genes PCSK9 a lo largo de un periodo de una semana o más. La introducción satisfactoria de los vectores de la invención en células huésped puede monitorizarse usando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, puede
20 señalizarse la transfección transitoria con un indicador, tal como un marcador fluorescente, tal como proteína fluorescente verde (GFP). La transfección estable de células *ex vivo* puede garantizarse usando marcadores que proporcionan a las células transfectadas resistencia a factores medioambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tal como resistencia a higromicina B.

25 Las moléculas de ARNbc específicas para PCSK9 también pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica para pacientes humanos. Pueden administrarse vectores de terapia génica a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase la patente de EE.UU. 5.328.470) o mediante inyección estereotáctica (véase por ejemplo, Chen *et al.* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente
30 aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que el vehículo de administración génica está incrustado. Alternativamente, cuando el vector de administración génica completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración génica.

35 Los expertos en la técnica están familiarizados con métodos y composiciones además de los específicamente expuestos en la presente descripción que les permitirán poner en práctica esta invención en el alcance completo de las reivindicaciones adjuntas a continuación en el presente documento.

Tabla 1

posición en el registro humano n.º	Secuencia de hebra sentido (5'-3')	SE Q ID NO:	Secuencia de hebra antisentido (5'-3')	SE Q ID NO:	Nombre del dúplex	Porcentaje medio del transcrito de ARNm restante a la concentración de ARNc restante en tipo celular				CI50 en HepG 2 [nM]	CI50 en hepatócito de mono- cyn- mologous e [nM]
						100 nM/ HepG 2	30 nM/ HepG 2	30 nM/ HepG 2	30 nM/ HepG 2		
NIM_174936	AGCGACGUCAGGCGCUCATT	1	UGAGCGCCUUGACGUCGCTT	2	AD- 15220				35		
2-20	CGCUAUGGUUGCAGGCGGTT	3	CCGCCUGCAACCAUGAGCGTT	4	AD- 15275				56		
15-33	GCUC AUGGUUGCAGGCGGTT	5	CCCGCCUGCAACCAUGAGCTT	6	AD- 15301				70		
16-34	CCGGCGCCCGCGUUCAGUUTT	7	ACUGAACGGCGGCGCCGCTT	8	AD- 15276				42		
30-48	CGGGCGCCCGCGUUCAGUUTT	9	AACUGAACGGCGGCGCCGCTT	10	AD- 15302				32		
31-49	GGGGCGCGCGUUCAGUUCTT	11	GAACUGAACGGCGGCGCCCTT	12	AD- 15303				37		
32-50	CCGUUCAGUUCAGGCGUCGTT	13	CAGACCCUGAACUGAACGCTT	14	AD- 15221				30		
40-58	UUCAGUUCAGGCGUCAGCTT	15	GCUCAGACCCUGAACUGAATT	16	AD- 15413				61		
43-61	GUGAGACUGGUCUGGCGGTT	17	CGCGCGAGCCAGUCUCACCTT	18	AD- 15304				70		
82-100	GGCGGCGCGGUCGUUGCTT	19	GCAACGACGCGUCCGCGCTT	20	AD- 15305				36		
100-118	GCGGCGCGGUCGUUGCATT	21	UGCAACGACGCGUCCGCGCTT	22	AD- 15306				20		
101-119	CCGGGACGCGUCGUUGCATT	23	CUGCAACGACGCGUCCGCGCTT	24	AD- 15307				38		
102-120	GGACGCGUGGUUGCAGCTT	25	CUGCUGCAACGACGCGUCCTT	26	AD- 15277				50		
105-123	UCCACGCCAGGAUUCGCGCTT	27	CGCGGAAUCCUGGUGGGATsT	28	AD- 9526	74	89				
135-153	ucccAGccAGGAuuuccGcTsT	29	CGCGGAAUCCUGGUGGGATsT	30	AD- 9652		97				
135-153	CCCAGCCAGGAUUCGCGGCTsT	31	GGCGGAAUCCUGGUGGGATsT	32	AD- 9519		78				
136-154	cccAGccAGGAuuuccGcTsT	33	CGCGGAAUCCUGGUGGGATsT	34	AD- 9645		66				
136-154	CAGCCAGGAUUCGCGCGCTsT	35	CGCGCGGAAUCCUGGUGGCTsT	36	AD- 9523		55				
138-156	cAGccAGGAuuuccGcTsT	37	CGCGCGGAAUCCUGGUGGCTsT	38	AD- 9649		60				
138-156	AGCUCCUGCACAGUCCUCCCTsT	39	GGAGGACUGUCCAGGAGCUTsT	40	AD- 9569		112				
185-203	AGuccuGcAcAGuccuccTsT	41	GGAGGACUGUCCAGGAGCUTsT	42	AD- 9695		102				
185-203											

205-223	CACCGCAAGGCUCUAAAGCGTT	43	CGCCUUGAGCCUUGCGGGT	44	AD-15222				75	
208-226	CGCAAGGCUCUAAAGCGCGTT	45	CGGCGCCUUGAGCCUUGCGTT	46	AD-15278				78	
210-228	CAAGGCUCUAAAGCGCGCGTT	47	GGCGGCGCCUUGAGCCUUGTT	48	AD-15178				83	
222-250	GUGGACCGGCACAGGCCUCITT	49	GAGGCCGUGCGCGGUCCACTT	50	AD-15308				84	
223-251	UGGACCGGCACAGGCCUCITT	51	AGAGGCCGUGCGCGGUCCACTT	52	AD-15223				67	
224-252	GGACCGGCACAGGCCUCUATT	53	UAGAGGCCGUGCGCGGUCCCTT	54	AD-15309				34	
235-253	GACCGGCACAGGCCUCUAGTT	55	CUAGAGGCCGUGCGCGGUCTT	56	AD-15279				44	
236-254	ACCGGCACAGGCCUCUAGTT	57	CCUAGAGGCCGUGCGCGGUCTT	58	AD-15194				63	
237-255	CCGCGCACAGGCCUCUAGGUTT	59	ACCUAGAGGCCGUGCGCGGTT	60	AD-15310				42	
238-256	CCGCGCACAGGCCUCUAGGUCTT	61	GACCUAGAGGCCGUGCGCGGTT	62	AD-15311				30	
239-257	GCGCACAGGCCUCUAGGUCUTT	63	AGACCUAGAGGCCGUGCGGCTT	64	AD-15392				18	
240-258	CGCACAGGCCUCUAGGUCUCTT	65	GAGACCUAGAGGCCGUGCGGTT	66	AD-15312				21	
248-266	CUCUAGGUCUCCUCGCCAGTT	67	CUGGCGAGGAGACCUAGAGTT	68	AD-15313				19	
249-267	UCUAGGUCUCCUCGCCAGGTT	69	CCUGGCGAGGAGACCUAGATT	70	AD-15280				81	
250-268	CUAGGUCUCCUCGCCAGGATT	71	UCCUGGCGAGGAGACCUAGTT	72	AD-15267				82	
252-270	AGGUCUCCUCGCCAGGACATT	73	UGUCCUGGCGAGGAGACCUUTT	74	AD-15314				32	
258-276	CCUCGCCAGGACAGCAACCTT	75	GGUUGCUUGUCCUGGCGAGGTT	76	AD-15315				74	
300-318	CGUCAGCUCCAGGCGGUCCTsT	77	GGACCGCCUGGAGCUGACCGTsT	78	AD-9624		94			
300-318	cGucAGuuccAGGeGGuuccTsT	79	GGACCGCCUGGAGCUGACCGTsT	80	AD-9750		96			
301-319	GUCAGCUCCAGGCGGUCCUTsT	81	AGGACCGCCUGGAGCUGACCTsT	82	AD-9623		43	66		
301-319	GucAGuuccAGGeGGuuccTsT	83	AGGACCGCCUGGAGCUGACCTsT	84	AD-9749		105			

370-388	GGCGCCCGUGGCGCAGGAGTT	85	CCUCCUGCGACGGGCGCCTT	86	AD-15384				48		
408-426	GGAGCUGGUGCUAGCCUUGTsT	87	CAAGGCUAGCACCGCUCTsT	88	AD-9607	32	28			0,20	
408-426	GGAGCuuGGuAGccuuGTsT	89	cAAGGCUAGcAcAGCUCTsT	90	AD-9733	78	73				
411-429	GCUGGUGCUAGCCUUGCGUTsT	91	ACGCAAGGCUAGCACCCAGCTsT	92	AD-9524	23	28			0,07	
411-429	GcuGGuGcuAGccuuGcGuTsT	93	ACGcAAGGCUAGcAcAGCTsT	94	AD-9650	91	90				
412-430	CUUGGUGCUAGCCUUGCGUUTsT	95	AACGCAAGGCUAGCACCCAGTsT	96	AD-9520	23	32				
412-430	CUUGGUGCUAGCCUUGCGUUTsT	97	AACGCAAGGCUAGCACCCAGTsT	98	AD-9520	23					
412-430	cUAGCuuGcGuuGcGuTsT	99	AACGcAAGGCUAGcAcAGTsT	100	AD-9646	97	108				
416-434	UGCUAGCCUUGCGUUGCCGATsT	101	UCGGAACGCAAGGCUAGCATsT	102	AD-9608	37					
416-434	uGcuAGccuuGcGuuGcGATsT	103	UCGGAACGcAAGGCUAGcATsT	104	AD-9734	91					
419-437	UAGCCUUGCGUUGCCGAGGATsT	105	UCCUCGGAACGCAAGGCUATsT	106	AD-9546	32					
419-437	uAGccuuGcGuuGcGAGGATsT	107	UCCUCGGAACGcAAGGCUATsT	108	AD-9672	57					
439-457	GACGGCCUGGCCGAAGCAGCTT	109	GUGCUUGGCCAGGCCGUCTT	110	AD-15385				54		
447-465	GGCCGAAGCACCCGAGCAGCTT	111	GUGCUGGGUGCUUGCGCCTT	112	AD-15393				31		
448-466	GCCGAAGCACCCGAGCAGCTT	113	CGUGCUGGGUGCUUGCGCTT	114	AD-15316				37		
449-467	CCGAAGCACCCGAGCAGCTT	115	CCGUGCUGGGUGCUUGCGGTT	116	AD-15317				37		
458-476	CCGAGCACGGAAACCACAGCTT	117	GCUGUGGUUCCGUGCUUGGTT	118	AD-15318				63		
484-502	CACCGCUGCGCCAAAGGAUUCTT	119	GAUCCUUGGCCAGCGGUGTT	120	AD-15195				45		
486-504	CCGUGCGGCCAAAGGAUCCGTT	121	CGGAUCCUUGGCCAGCGGTT	122	AD-15224				57		
487-505	CGCUGCGCCAAAGGAUCCGTT	123	ACGGAUCCUUGGCCAGCGTT	124	AD-15188				42		
489-507	CUGCGCAAGGAUCCGUGTT	125	CCACGGAUCCUUGGCCAGTT	126	AD-15225				51		

500-518	AUCCGUGGAGGUUGCCUGGTT	127	CCAGGCAACCUCCACCGAUTT	128	AD-15281				89		
509-527	GGUUGCCUGGCACCUACGUTT	129	ACGUAGGUGCCAGGCAACCTT	130	AD-15282				75		
542-560	AGGAGACCCACCUCCUGCAATT	131	UGCGAGAGGUGGGUCUCUCCUTT	132	AD-15319				61		
543-561	GGAGACCCACCUCCUGCAATT	133	CUGCGAGAGGUGGGUCUCUCCUTT	134	AD-15226				56		
544-562	GAGACCCACCUCCUGCAGUTT	135	ACUGCGAGAGGUGGGUCUCUCCUTT	136	AD-15271				25		
549-567	CCACCUCUCGCAGUCAGATT	137	CUCUGACUCGCAGAGGUGGTT	138	AD-15283				25		
552-570	CCUCUCGCAGUCAGAGCGCTT	139	GCGCUCUGACUGCGAGAGGTT	140	AD-15284				64		
553-571	CUCUCGCAGUCAGAGCGCAATT	141	UGCGCUCUGACUGCGAGAGTT	142	AD-15189				17		
554-572	UCUCGCAGUCAGAGCGCACTT	143	GUGCGCUCUGACUGCGAGATT	144	AD-15227				62		
555-573	CUCGCAGUCAGAGCGCACUTsT	145	AGUGCGCUCUGACUGCGAGTsT	146	AD-9547	31	29			0,20	
555-573	cucGcAGucAGAGcGcAucTsT	147	AGUGCGCUCUGACUGCGAGTsT	148	AD-9673	56	57				
558-576	GCAGUCAGAGCGCACUGCCTsT	149	GCGAGUGCGCUCUGACUGCTsT	150	AD-9548	54	60				
558-576	GcAGucAGAGcGcAucGccTsT	151	GGcAGUGCGCUCUGACUGCTsT	152	AD-9674	36	57				
606-624	GGGAUACCCUCACCAAGAUCTsT	153	GAUCUUGGUGAGGUAUCCCTsT	154	AD-9529	60					
606-624	GGGAuAccucAccAAGAUcTsT	155	GAUCUUGGUGAGGUAUCCCTsT	156	AD-9655	140					
659-677	UGGUGAAGAUAGUGGCGATsT	157	UCGCCACUCAUCUUCACCATsT	158	AD-9605	27	31			0,27	
659-677	uGGuGAAGAuGAGuGcGcGATsT	159	UCGCcACUcAUcUUCcAcATsT	160	AD-9731	31	31			0,32	
663-681	GAAGAUGAGUGGCGACCUGTsT	161	CAGGUCGCCACUCACUUCUcTsT	162	AD-9596	37					
663-681	GAAGAUcGAGuGcGcGccuGTsT	163	cAGGUCGCcACUcAUcUUCUcTsT	164	AD-9722	76					
704-722	CCCAUGUCGACUACAUCGATsT	165	UCGAUGUAGUCGACAUGGGTsT	166	AD-9583	42					
704-722	cccAuGucGAcuAcAucGATsT	167	UCGAUGuAGUcGAcAucUGGGTsT	168	AD-9709	104					

718-736	AUCGAGGAGGACUCCUCUGTsT	169	CAGAGGAGUCCUCCUGAUTsT	170	AD-9579				113			
718-736	AucGAGGAGGAcuccucUGTsT	171	cAGAGGAGUCCUCCUGAUTsT	172	AD-9705				81			
758-776	GGAAccUGGAGCGGAUUAcCTT	173	GUAAUCCGCUCCAGGUUCCTT	174	AD-15394						32	
759-777	GAACcUGGAGCGGAUUAcCTT	175	GGUAAUCCGCUCCAGGUUCCTT	176	AD-15196						72	
760-778	AACcUGGAGCGGAUUAcCTT	177	GGGUAUCCGCUCCAGGUUTT	178	AD-15197						85	
777-795	CCCUCCACGGUACCGGCGGTT	179	CGCCCGGUACCGUGGAGGGTT	180	AD-15198						71	
782-800	CACGGUACCGGCGGAUGATsT	181	UCAUCCGCGCGUACCGUGTsT	182	AD-9609			66	71			
782-800	cAcGUAcCGGcGGAUgATsT	183	UcAUCCGCGCGGuACCGUGTsT	184	AD-9735				115			
783-801	ACGGUACCGGCGGAUGAAATsT	185	UUAUCCGCGCGGUACCGUTsT	186	AD-9537				145			
783-801	AcGGUAcCGGcGGAUgATsT	187	UUAUCCGCGCGGuACCGUTsT	188	AD-9663				102			
784-802	CGGUACCGGCGGAUGAAUTsT	189	AUUAUCCGCGCGGUACCGTsT	190	AD-9528				113			
784-802	cGGUAcCGGcGGAUgATsT	191	AUUAUCCGCGCGGuACCGTsT	192	AD-9654				107			
785-803	GGUACCGGCGGAUGAAUATsT	193	UAUUAUCCGCGCGGUACCTsT	194	AD-9515				49			
785-803	GGUAcCGGcGGAUgAAUATsT	195	uAUUAUCCGCGCGGuACCTsT	196	AD-9641				92			
786-804	GUACCGGCGGAUGAAUAcTsT	197	GUUAUUAUCCGCGCGUAcTsT	198	AD-9514				57			
786-804	GUAcCGGcGGAUgAAUAcTsT	199	GUUAUUAUCCGCGCGGuAcTsT	200	AD-9640				89			
788-806	ACCGGCGGAUGAAUACCATsT	201	UGGUUAUUAUCCGCGCGGUTsT	202	AD-9530				75			
788-806	AcCGGcGGAUgAAUAcATsT	203	UGGuUAUUAUCCGCGCGGUTsT	204	AD-9656				77			
789-807	CCGGGCGGAUGAAUACCACTsT	205	CUUGUAUUAUCCGCGCGGCTsT	206	AD-9538			79	80			
789-807	ccGGGcGGAUgAAUAcAGTsT	207	CUUGGuUAUUAUCCGCGCGGCTsT	208	AD-9664				53			
825-843	CCUGGUGGAGGUGUAUCUCTsT	209	GAGUAUACACCUCCACCAAGTsT	210	AD-9598			69	83			

825-843	cuUGuGGAGGGuGuAucucTst	211	GAGAuAcACCUCcAcAGGTst	212	AD-9724		127		
826-844	CUGGUGGAGGUGUAUCUCCTst	213	GGAGUAACACCUCCACCACTst	214	AD-9625	58	88		
826-844	cuGGuGGAGGGuGuAucuccTst	215	GGAGAuAcACCUCcAcAGTst	216	AD-9751		60		
827-845	UGGUGGAGGUGUAUCUCCTst	217	AGGAGUAACACCUCCACCACTst	218	AD-9556		46		
827-845	uGGuGGAGGGuGuAucuccuTst	219	AGGAGAuAcACCUCcAcATst	220	AD-9682		38		
828-846	GGUGGAGGUGUAUCUCCTst	221	UAGGAGUAACACCUCCACCTst	222	AD-9539	56	63		
828-846	GGUGGAGGGuGuAucuccuATst	223	uAGGAGAuAcACCUCcAcCTst	224	AD-9665		83		
831-849	GGAGGUGUAUCUCCTst	225	GUCUAGGAGUAACACCUCCCTst	226	AD-9517		36		
831-849	GGAGGGuGuAucuccuAGAcTst	227	GUCuAGGAGAuAcACCUCCTst	228	AD-9643		40		
833-851	AGGUGUAUCUCCTst	229	GUGUCUAGGAGUAACACCUCTst	230	AD-9610		36	34	0,04
833-851	AGGUGuGuAucuccuAGAcTst	231	GUGUCuAGGAGAuAcACCUTst	232	AD-9736		22	29	0,04
833-851	AfgGGuGuAfuCfuCfcUfaGfaCfaCTst	233	p-gUfgUfcUfaGfgAfuAfcAfcCfuTst	234	AD-14681			33	
833-851	AGGUfGuAfuCfuCfcUfaGfaCfaCTst	235	GUfGuCfuUfaGfgAGAUfAfcAfcCfuTst	236	AD-14691			27	
833-851	AgGuGuAuCuCcuCcaGacCaCTst	237	p-gUfgUfcUfaGfgAfuAfcAfcCfuTst	238	AD-14701			32	
833-851	AgGuGuAuCuCcuCcaGacCaCTst	239	GUfGuCfuUfaGfgAGAUfAfcAfcCfuTst	240	AD-14711			33	
833-851	AfgGGuGuAfuCfuCfcUfaGfaCfaCTst	241	GUGUCuAGGAGUAACAcuTst	242	AD-14721			22	
833-851	AGGUfGuAfuCfuCfcUfaGfaCfaCTst	243	GUGUCuAGGAGUAACAcuTst	244	AD-14731			21	
833-851	AgGuGuAuCuCcuCcaGacCaCTst	245	GUGUCuAGGAGUAACAcuTst	246	AD-14741			22	
833-851	GfcAfcCfcUfcAfuAfgGfcCfuGfgATst	247	p-uCfcAfgGfcCfuAfuGfgGfgGfuGfcTst	248	AD-15087			37	
833-851	GCFACfCfCfUfCfUfAGGfCfUfGGAfTst	249	UfCfCfAGGfCfUfUfUfAGGGUfGfCfTst	250	AD-15097			51	
833-851	GcAcCcUcAuAgGcCuGgATst	251	p-uCfcAfgGfcCfuAfuGfgGfgGfuGfcTst	252	AD-15107			26	

833-851	GcAcCeUcAuAgGcCuGgATsT	253	UICICfAGGCfCfUfAUfAGAGGGuICfCfTsT	254	AD-15117				28
833-851	GfcAfCfCfUfCfAfUfAfGfCfCfUfGfAfTsT	255	UCCAGgcCUauGAGGGUgcTsT	256	AD-15127				33
833-851	GCfACfCfCfUfCfAUfAGGcCfCfUfCGATsT	257	UCCAGgcCUauGAGGGUgcTsT	258	AD-15137				54
833-851	GcAcCeUcAuAgGcCuGgATsT	259	UCCAGgcCUauGAGGGUgcTsT	260	AD-15147				52
836-854	UGUAUCUCCUAGACACcAGTsT	261	CUGGUUCUAGGAGAUACATsT	262	AD-9516	94			
836-854	uGuAUuccuUAGAcAccAGTsT	263	CUGGUUCUAGGAGAUACATsT	264	AD-9642	105			
840-858	UCUCCUAGACACcAGCAUATsT	265	UAUGCUGGUUCUAGGAGATsT	266	AD-9562	46	51		
840-858	uccuccuAGAcAccAGcAuATsT	267	uAUGCUGGUUCUAGGAGATsT	268	AD-9688	26	34		4,20
840-858	UfcUfCfCfUfAfCfAfCfGfCfAfUfATsT	269	p-uAfUfGfUfGfUfGfUfCfUfAfGfGfATsT	270	AD-14677				38
840-858	UfCfUfCfCfUfFAGACfACfCfAGCfAUfATsT	271	UfAUfGcCfUfCfGfUfCfUfCfUfAGGAGATsT	272	AD-14687				52
840-858	UcUcCuAgAcAcCaGcAuATsT	273	p-uAfUfGfUfGfUfGfUfCfUfAfGfGfATsT	274	AD-14697				35
840-858	UcUcCuAgAcAcCaGcAuATsT	275	UfAUfGcCfUfCfGfUfCfUfCfUfAGGAGATsT	276	AD-14707				58
840-858	UfcUfCfCfUfAfCfAfCfGfCfAfUfATsT	277	UAUGCugGUguCUAGGagATsT	278	AD-14717				42
840-858	UfCfUfCfCfUfFAGACfACfCfAGCfAUfATsT	279	UAUGCugGUguCUAGGagATsT	280	AD-14727				50
840-858	UcUcCuAgAcAcCaGcAuATsT	281	UAUGCugGUguCUAGGagATsT	282	AD-14737				32
840-858	AfGfCfCfUfGfAfGfUfUfUfUfUfCfGfTsT	283	p-cCfGfAUfAfCfUfCfCfAfGfGfCfUfTsT	284	AD-15083				16
840-858	AGGCfCfUfGGAGUfUfUfUfUfUfCfGfTsT	285	CfCfGAAUfAAACfUfCfCfAGGCfCfUfTsT	286	AD-15093				24
840-858	AgGcCuGgAgUuUaUcGgTsT	287	p-cCfGfAUfAfCfUfCfCfAfGfGfCfUfTsT	288	AD-15103				11
840-858	AgGcCuGgAgUuUaUcGgTsT	289	CfCfGAAUfAAACfUfCfCfAGGCfCfUfTsT	290	AD-15113				34
840-858	AfGfCfCfUfGfAfGfUfUfUfUfUfCfGfTsT	291	CCGAUAuaAAcuCCAGGccuTsT	292	AD-15123				19
840-858	AGGCfCfUfGGAGUfUfUfUfUfUfCfGfTsT	293	CCGAUAuaAAcuCCAGGccuTsT	294	AD-15133				15

840-858	AgGcCuGgAgUuUaUuUcGgTsT	295	CCGAAUuAAcuCCAGGccuTsT	296	AD-15143				16		
841-859	CUCCUAGACACCAGCAUACTsT	297	GUAUGCUGGUGUcUAGGAGTsT	298	AD-9521		50				
841-859	cuccuAGAcAccAGcAuAcTsT	299	GUAUGCUGGUGUcUAGGAGTsT	300	AD-9647		62				
842-860	UCCUAGACACCAGCAUACATsT	301	UGUAUGCUGGUGUcUAGGATsT	302	AD-9611		48				
842-860	uccuAGAcAccAGcAuAcTsT	303	UGUAUGCUGGUGUcUAGGATsT	304	AD-9737		68				
843-861	CCUAGACACCAGCAUACAGTsT	305	CUGUAUGCUGGUGUcUAGGTsT	306	AD-9592		55				
843-861	ccuAGAcAccAGcAuAcTsT	307	CUGUAUGCUGGUGUcUAGTsT	308	AD-9718		78				
847-865	GACACCAGCAUACAGUGTsT	309	CACUCUGUAUGCUGGUGUCTsT	310	AD-9561		64				
847-865	GAcAccAGcAuAcAGAGUGTsT	311	cACUCUGUAUGCUGGUGUCTsT	312	AD-9687		84				
855-873	CAUACAGAGUGACCACCGTsT	313	CCGGUGGUGACUCUGUAUGTsT	314	AD-9636		42	41		2,10	
855-873	cAuAcAGAGuGAcAccGGTsT	315	CCGGUGGUGAcUCUCUGUAUGTsT	316	AD-9762		9	28		0,40	
860-878	AGAGUGACCACCGGAAAUTsT	317	AUUUCCCGGUGGUGACUCUTsT	318	AD-9540		45				
860-878	AGAGuGAcAccAcCGGAAAuTsT	319	AUUUCCCGGUGGUGAcUCUTsT	320	AD-9666		81				
861-879	GAGUGACCACCGGAAAUCTsT	321	GAUUUCCCGGUGGUGACUCTsT	322	AD-9535		73				
861-879	GAGuGAcAccAcCGGAAAucTsT	323	GAUUUCCCGGUGGUGAcUCTsT	324	AD-9661		83				
863-881	GUAGACCACCGGAAAUCGATsT	325	UCGAUUUCCCGGUGGUGACTsT	326	AD-9559		35				
863-881	GuGAcAccAcCGGAAAucGATsT	327	UCGAUUUCCCGGUGGUGAcACTsT	328	AD-9685		77				
865-883	GACCACCGGAAAUCGAGTsT	329	CCUCGAUUUCCCGGUGGUGTsT	330	AD-9533		100				
865-883	GAcAccAcCGGAAAucGAGTsT	331	CCUCGAUUUCCCGGUGGUGTsT	332	AD-9659		88				
866-884	ACCACCGGAAAUCGAGGTsT	333	CCCUCGAUUUCCCGGUGGUTsT	334	AD-9612		122				
866-884	AccAccCGGAAAucGAGGTsT	335	CCCUCGAUUUCCCGGUGGUTsT	336	AD-9738		83				

867-885	CCACCGGAAAUCGAGGCTsT	337	GCCCUCGAUUUCGCCGGUGGTsT	338	AD-9557	75	96		
867-885	ccAccGGGAAAucGAGGcTsT	339	GCCCUCGAUUUCGCCGGUGGTsT	340	AD-9683	48			
875-893	AAAUCGAGGCGAGGUCAUtTsT	341	AUGACCCUGCCCCUGGAUUUtTsT	342	AD-9531	31	32		0,53
875-893	AAAucGAGGcAGGGuCAuTsT	343	AUGACCCUGCCCCUGGAUUUtTsT	344	AD-9657	23	29		0,66
875-893	AfaAfuCfGAlGfGfCfAGfGfGfCfAUfTsT	345	p-aUfGAlfCfGfCfGfCfGfCfGfAUfTsT	346	AD-14673			81	
875-893	AAAUfCfGAGGCGfAGGGuCfAUfTsT	347	AUfGACfCfCfUfGfCfCfCfCfUfGfCfAUfTsT	348	AD-14683			56	
875-893	AaAuCgAgCgCgGGuCAuTsT	349	p-aUfGAlfCfGfCfGfCfGfCfGfAUfTsT	350	AD-14693			56	
875-893	AaAuCgAgCgCgGGuCAuTsT	351	AUfGACfCfCfUfGfCfCfCfCfUfGfCfAUfTsT	352	AD-14703			68	
875-893	AfaAfuCfGAlGfGfCfAGfGfGfCfAUfTsT	353	AUGACccUGccCUGCGAuuTsT	354	AD-14713			55	
875-893	AAAUfCfGAGGCGfAGGGuCfAUfTsT	355	AUGACccUGccCUGCGAuuTsT	356	AD-14723			24	
875-893	AaAuCgAgCgCgGGuCAuTsT	357	AUGACccUGccCUGCGAuuTsT	358	AD-14733			34	
875-893	CfGfGfCfAlfCfUfCfAlfAUfGfCfGfGfTsT	359	p-cAlfGfCfCfAUfGfGfGfGfGfGfCfGfTsT	360	AD-15079			85	
875-893	CfGfGfCfCfCfCfUfCfAUfAGGfCfCfUfGfTsT	361	CfAGGfCfCfUfAUfGfAGGfGfGfGfCfCfGfTsT	362	AD-15089			54	
875-893	CgGAcCcUcAUgAcCuGtsT	363	p-cAlfGfCfCfAUfGfGfGfGfGfGfCfGfTsT	364	AD-15099			70	
875-893	CgGAcCcUcAUgAcCuGtsT	365	CfAGGfCfCfUfAUfGfAGGfGfGfGfCfCfGfTsT	366	AD-15109			67	
875-893	CfGfGfCfAlfCfUfCfAlfAUfGfCfGfGfTsT	367	CAGGfCcuAUgaGGGUGccgTsT	368	AD-15119			67	
875-893	CfGfGfCfCfCfCfUfCfAUfAGGfCfCfUfGfTsT	369	CAGGfCcuAUgaGGGUGccgTsT	370	AD-15129			57	
875-893	CgGAcCcUcAUgAcCuGtsT	371	CAGGfCcuAUgaGGGUGccgTsT	372	AD-15139			69	
877-895	AUCGAGGCGAGGGuCAUGGTsT	373	CCAUGACCCUGCCCCUGCAUtsT	374	AD-9542	160			
877-895	AucGAGGGcAGGGueAuGtTsT	375	CcAUGACCCUGCCCCUGCAUtsT	376	AD-9668	92			
878-896	cGAGGcAGGGuAuGucTsT	377	GACcAUGACCCUGCCCCUGCGtsT	378	AD-9729	109			

880-898	GAGGCAGGGUCAUGGUCAATsT	379	UGACCAUGACCCUGCCCUCTsT	380	AD-9637	56	83			
880-898	GAGGcAGGGucAuGGuCATsT	381	UGAcAuGACCCUGCCCUCTsT	382	AD-9763		79			
882-900	GGGCAGGGUCAUGGUCAACCTsT	383	GGUGACCAUGACCCUGCCCTsT	384	AD-9630		82			
882-900	GGGcAGGGucAuGGuCAcTsT	385	GGUGAcAuGACCCUGCCCTsT	386	AD-9756		63			
885-903	CAGGUCAUGGUCAACCGACTsT	387	GUCGGUGACCAUGACCCUGTsT	388	AD-9593		55			
885-903	cAGGUcAuGGuCAcCGAcTsT	389	GUCGGUGAcAuGACCCUGTsT	390	AD-9719		115			
886-904	AGGUCAUGGUCAACCGACUTsT	391	AGUCGGUGACCAUGACCCUTsT	392	AD-9601		111			
886-904	AGGUcAuGGuCAcCGAcuTsT	393	AGUCGGUGAcAuGACCCUTsT	394	AD-9727		118			
892-910	AUGGUACCGACUUCGAGATsT	395	UCUCGAAUGUCGGUGACCAUTsT	396	AD-9573		36	42	1,60	
892-910	AuGGuCAcCGAGAcuGAGATsT	397	UCUCGAAUGUCGGUGAcAuTsT	398	AD-9699		32	36	2,50	
899-917	CCGACUUCGAGAAUGUGCCTT	399	GGCACAUUCUCGAAUGUCGGTT	400	AD-15228				26	
921-939	GGAGGACGGGACCCGUUCTT	401	GAAGCGGUGUCCGUGCCUCTT	402	AD-15395				53	
993-1011	CAGCGCCGGGAUGCCGGCTsT	403	GCCGGCAUCCCGCGCGUGTsT	404	AD-9602		126			
993-1011	cAGcGGccGGGAuGccGGcTsT	405	GCCGGcAuCCCGCGCGUGTsT	406	AD-9728		94			
1020-1038	GGUGCCAGCAUGCCGAGCTT	407	GCUGCGCAUGCUGGCACCCCTT	408	AD-15386				45	
1038-1056	CCUGCGGUGGCUCAACUGCTsT	409	GCAGUUGAGCACGCGCAGGTsT	410	AD-9580		112			
1038-1056	ccuGcGcGuGcucAAcuGcTsT	411	GcAGUUGAGAcCGCGcAGGTsT	412	AD-9706		86			
1040-1058	UGCGCGUGGCUCAACUGCCATsT	413	UGGCAGUUGAGCAGCGGCATsT	414	AD-9581		35			
1040-1058	uGcGcGuGcucAAcuGccATsT	415	UGGcAGUUGAGcACGGCcATsT	416	AD-9707		81			
1042-1060	CGCGUGGCUCAACUGCCAAAGTsT	417	CUUGCAGUUGAGCAGCGGTsT	418	AD-9543		51			
1042-1060	cGcGuGcucAAcuGccAAAGTsT	419	CUUGGcAGUUGAGcACCGGTsT	420	AD-9669		97			

1053-1071	CUGCCAAAGGGAAGGGCACGTsT	421	CGUGCCUUCUUUGGCACTsT	422	AD-9574	74			
1053-1071	cuGccAAAGGGAAGGGAcGTsT	423	CGUGCCUUCUUUGGAcGTsT	424	AD-9700				
1057-1075	CAAGGGAAGGGCACGGUUAAT	425	UAACCGUGCCCUUCCCUUGTT	426	AD-15320		26		
1058-1076	AAGGGAAGGGCACGGUUAAT	427	CUAACCGUGCCCUUCCCUUUTT	428	AD-15321		34		
1059-1077	AGGGAAGGGCACGGUUAAGCTT	429	GCUAACCGUGCCCUUCCCUUTT	430	AD-15199		64		
1060-1078	GGGAAGGGCACGGUUAAGCGTT	431	CGCUAACCGUGCCCUUCCCTT	432	AD-15167		86		
1061-1079	GGAAGGGCACGGUUAAGCGTT	433	CCGCUAACCGUGCCCUUCCCTT	434	AD-15164		41		
1062-1080	GAAGGGCACGGUUAAGCGCTT	435	GCCGCUAACCGUGCCCUUCTT	436	AD-15166		43		
1063-1081	AAGGGCACGGUUAAGCGCATT	437	UGCCGCUAACCGUGCCCUUUTT	438	AD-15322		64		
1064-1082	AGGGCACGGUUAAGCGCATT	439	GUGCCGCUAACCGUGCCCUUTT	440	AD-15200		46		
1068-1086	CACGGUUAAGCGGCACCCUUTT	441	GAGGGUGCCGCUAACCGUGTT	442	AD-15213		27		
1069-1087	ACGGUUAAGCGGCACCCUATT	443	UGAGGGUGCCGCUAACCGUGTT	444	AD-15229		44		
1072-1090	GUUAGCGGCACCCUCAUAGTT	445	CUAUGAGGGUGCCGCUAACTT	446	AD-15215		49		
1073-1091	UUAAGCGGCACCCUCAUAGTT	447	CCUAUGAGGGUGCCGCUAATT	448	AD-15214		101		
1076-1094	GCGGCACCCUCAUAGGCCUTsT	449	AGGCCUAUGAGGGUGCCGCTsT	450	AD-9315	15	32	0,98	
1079-1097	GCACCCUCAUAGGCCUGGATsT	451	UCCAGGCCUAUGAGGGUGGCTsT	452	AD-9326	35	51		
1085-1103	UCAUAGGCCUGGAGUUUAUTsT	453	AUAAACUCCAGGCCUAUGATsT	454	AD-9318	14	37	0,40	
1090-1108	GCCUGGAGUUUAUUCGGATsT	455	UCCGAAUAAACUCCAGGCCCTsT	456	AD-9323	14	33		
1091-1109	GCCUGGAGUUUAUUCGGAAATsT	457	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	458	AD-9314	11	22	0,04	
1091-1109	GccuGGAGuuuAuuGGAAATsT	459	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	460	AD-10792			0,10	0,10
1091-1109	GccuGGAGuuuAuuGGAAATsT	461	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	462	AD-10796			0,1	0,1

1093-1111	CUGGAGUUUAUUCGGAAAAATsT	463	UUUUCCGAAUAAACUCCAGTsT	464	AD-9638				101				
1093-1111	cuGGAGuuuAuuCGGAAAAATsT	465	UUUUCCGAAUAAACUCcAGTsT	466	AD-9764				112				
1095-1113	GGAGUUUAUUCGGAAAAAGCTsT	467	GCUUUCCGAAUAAACUCCTsT	468	AD-9525				53				
1095-1113	GGAGuuuAuuCGGAAAAAGcTsT	469	GCUUUCCGAAUAAACUCcCTsT	470	AD-9651				58				
1096-1114	GAGUUUAUUCGGAAAAAGCCTsT	471	GGCUUUUCCGAAUAAACUCTsT	472	AD-9560				97				
1096-1114	GAGuuuAuuCGGAAAAAGccTsT	473	GGCUUUUCCGAAUAAACUCtTsT	474	AD-9686				111				
1100-1118	UUAUUCGGAAAAAGCCAGCUTsT	475	AGCUGGCUUUUCCGAAUAAATsT	476	AD-9536				157				
1100-1118	uuAuuCGGAAAAAGccAGcTsT	477	AGCUGGCUUUUCCGAAuAAATsT	478	AD-9662				81				
1154-1172	CCCUGCCGGUGGGUACAGTsT	479	CUGUACCCACCCGCCAGGGTsT	480	AD-9584		52		68				
1154-1172	cccuGGcGGGuGGGuAcAGTsT	481	CUGuACcAcCCCGCcAGGGTsT	482	AD-9710				111				
1155-1173	CCUGCCGGUGGGUACAGCTT	483	GCUGUACCCACCCGCCAGGTT	484	AD-15323			62					
1157-1175	UGCGGGUGGGUACAGCCGTsT	485	CGGUGUACCCACCCGCCATsT	486	AD-9551				91				
1157-1175	uGgcGGGuGGGuAcAGcTsT	487	CGGCUGuACcAcCCCGCcATsT	488	AD-9677				62				
1158-1176	GGCGGGUGGGUACAGCCGCTT	489	GCGGUGUACCCACCCGCCCTT	490	AD-15230			52					
1162-1180	GGUGGUACAGCCCGGUCCTT	491	GGACGCGGUGUACCCACCTT	492	AD-15231			25					
1164-1182	UGGUUACAGCCCGGUCUCTT	493	GAGGACGCGGUGUACCCATT	494	AD-15285			36					
1172-1190	GCCGCGUCCUCAACGCCGCTT	495	GCGGCGUUGAGGACGCGGCTT	496	AD-15396			27					
1173-1191	CCGCGUCCUCAACGCCGCTT	497	GGCGGCGUUGAGGACGCGGTT	498	AD-15397			56					
1216-1234	GUCGUGUGGUCACCGCUGTsT	499	CAGCGGUGACCAAGCAGCAGTsT	500	AD-9600				112				
1216-1234	GucGuGuGucAccGcuGTsT	501	cAGCGGUGACcAGcACGACTsT	502	AD-9726				95				
1217-1235	UCGUGCUGGUCACCGCUGCTsT	503	GCAGCGGUGACCAAGCAGATsT	504	AD-9606				107				

1217-1235	ucGuGucAccGcuGcTsT	505	GcAGCGGUGACcAGcACGATsT	506	AD-9732		105		
1223-1241	UGGUACCGCUGCCGGCAATsT	507	UUGCCGGCAGCGGUGACCATsT	508	AD-9633	56	75		
1223-1241	uGGuCAccGcuGccGGcAAATsT	509	UUGCCGGcAGCGGUGACcATsT	510	AD-9759		111		
1224-1242	GGUACCGCUGCCGGCAACTsT	511	GUUGCCGGcAGCGGUGACCTsT	512	AD-9588		66		
1224-1242	GGUcAccGcuGccGGcAAcTsT	513	GUUGCCGGcAGCGGUGACCTsT	514	AD-9714		106		
1227-1245	CACCGCUGCCGGCAACUUCTsT	515	GAAGUUGCCGGcAGCGGUGTsT	516	AD-9589	67	85		
1227-1245	cAccGcuGccGGcAAcUucTsT	517	GAAGUUGCCGGcAGCGGUGTsT	518	AD-9715		113		
1229-1247	CCGCUGCCGGCAACUUCGGTsT	519	CGGAAGUUGCCGGcAGCGTsT	520	AD-9575		120		
1229-1247	ccGcuGccGGcAAcUucTsT	521	CGGAAGUUGCCGGcAGCGTsT	522	AD-9701		100		
1230-1248	CGCUGCCGGCAACUUCGGTsT	523	CCGGAAGUUGCCGGcAGCGTsT	524	AD-9563		103		
1230-1248	cGcuGccGGcAAcUucTsT	525	CCGGAAGUUGCCGGcAGCGTsT	526	AD-9689		81		
1231-1249	GCUGCCGGCAACUUCGGTsT	527	CCCGGAAGUUGCCGGcAGCTsT	528	AD-9594	80	95		
1231-1249	GcuGccGGcAAcUucTsT	529	CCCGGAAGUUGCCGGcAGCTsT	530	AD-9720		92		
1236-1254	CGGCAACUUCGGGACGAUTsT	531	AUCGUCCGGAAAGUUGCGTsT	532	AD-9585		83		
1236-1254	cGGcAAcUucTsT	533	AUCGUCCGGAAAGUUGCGTsT	534	AD-9711		122		
1237-1255	GGCAACUUCGGGACGAUTsT	535	CAUCGUCCGGAAAGUUGCGTsT	536	AD-9614		100		
1237-1255	GGcAAcUucTsT	537	cAUCGUCCGGAAAGUUGCGTsT	538	AD-9740		198		
1243-1261	UUCGGGACGAUCCUGCCTsT	539	GGCAGGCAUCGUCCGGAAATsT	540	AD-9615		116		
1243-1261	uuccGGGAcGauGcuGccTsT	541	GGcAGGcAUCGUCCGGAAATsT	542	AD-9741		130		
1248-1266	GGACGAUCCUGCCUCUACTsT	543	GUAGAGGcAGGCAUCGUUCCTsT	544	AD-9534		32	30	
1248-1266	GGACGAUCCUGCCUCUACTsT	545	GUAGAGGcAGGCAUCGUUCCTsT	546	AD-9534		32		

1248-1266	GGAGcGauGccuGccuucAcTsT	547	GuAGAGGcAGGcAUCGUCCTsT	548	AD-9660		89	79		
1279-1297	GCUCCCGAGGUCAUCACAGTT	549	CUGUGAUGACCUCGGAGCTT	550	AD-15324				46	
1280-1298	CUCCCGAGGUCAUCACAGUTT	551	ACUGUGAUGACCUCGGAGTT	552	AD-15232				19	
1281-1299	UCCCGAGGUCAUCACAGUUTT	553	AACUGUGAUGACCUCGGATT	554	AD-15233				25	
1314-1332	CCAAGACcAGCCGGUGACCTT	555	GGUCACcCGCUGGUCUUGGTT	556	AD-15234				59	
1315-1333	CAAGACcAGCCGGUGACCCCTT	557	GGGUCACcCGCUGGUCUUGTT	558	AD-15286				109	
1348-1366	ACCAACUUUGCCCGCUGUGTsT	559	CACAGCGGCCAAAGUUGGUTsT	560	AD-9590		122			
1348-1366	AccAAccuuuGGcGcuGuTsT	561	cAcAGCGGCcAAAGUUGGUTsT	562	AD-9716		114			
1350-1368	CAACUUUGCCCGCUGUGTsT	563	CACACAGCGGCCAAAGUUGTsT	564	AD-9632		34			
1350-1368	cAAccuuuGGcGcuGuTsT	565	cAcAcAGCGGCcAAAGUUGTsT	566	AD-9758		96			
1360-1378	CGCUGUGUGGACCUCUUUGTsT	567	CAAAGAGGUCCACACAGCGTsT	568	AD-9567		41			
1360-1378	cGcuGuGuGGAccuuuGTsT	569	cAAAGAGGUCCAcAcAGCGTsT	570	AD-9693		50			
1390-1408	GACAUCAUUGGUGCCUCCATsT	571	UGGAGGCACCAAUAGAUGUCTsT	572	AD-9586	81	104			
1390-1408	GAcAucAuuGGuGccuccATsT	573	UGGAGGcAcAAUGAUGUCTsT	574	AD-9712		107			
1394-1412	UCAUUGGU'GCCUCCAGCGATsT	575	UCGCU'GGAGGcACCAAUAGATsT	576	AD-9564		120			
1394-1412	ucAuuGGuGccuccAGcGATsT	577	UCGCU'GGAGGcAcAAUAGATsT	578	AD-9690		92			
1417-1435	AGCACcUGCUUUUGUGUCACTsT	579	GUGACACAAAAGCAGGUGCUTsT	580	AD-9616	74	84			
1417-1435	AGcAccuGcuuuGuGucAcTsT	581	GUGAcAcAAAAGcAGGUGCUTsT	582	AD-9742		127			
1433-1451	CACAGAGUGGGACAUACACATT	583	UGUGAUGUGCCcACUCUGGTT	584	AD-15398				24	
1486-1504	AUGCUGUCUGCCGAGCCGGTsT	585	CCGGCUGCGCAGACAGCAUTsT	586	AD-9617		111			
1486-1504	AuGcuGcuuGccGAGcGGTsT	587	CCGGCUGCGGcAGAcAGcAUTsT	588	AD-9743		104			

1491-1509	GUCUGCCGAGCCGGAGCUCTsT	589	GAGCUCGGCUCGGCAGACTsT	590	AD-9635	73	90		
1491-1509	GuccGccGAGccGGAGeucTsT	591	GAGCUCGGCUCGGCAGACTsT	592	AD-9761		83		
1521-1539	GUUGAGGCAGAGACUGAUCTsT	593	GAUCAGUCUCUGCCUCAACTsT	594	AD-9568		76		
1521-1539	GuuGAGGcAGAGAcuGaucTsT	595	GAUcAGUCUCUGCCUcAACTsT	596	AD-9694		52		
1527-1545	GCAGAGACUGAUCCACUUCTsT	597	GAAUGGGAUCAGUCUGUCTsT	598	AD-9576		47		
1527-1545	GcAGAGAcuGAuccAcuucTsT	599	GAAUGGGAUcAGUCUCUGCTsT	600	AD-9702		79		
1529-1547	AGAGACUGAUCCACUUCTsT	601	GAGAAGUGGAUCAGUCUCUTsT	602	AD-9627		69		
1529-1547	AGAGAcuGAuccAcuucTsT	603	GAGAAGUGGAUcAGUCUCUTsT	604	AD-9753		127		
1543-1561	UUCUCUGCCAAAGAUGUCATsT	605	UGACAUCUUUGGCAGAGAA TsT	606	AD-9628		141		
1543-1561	uuucuuGccAAAGAuGucATsT	607	UGAcAUCUUUGGcAGAGAA TsT	608	AD-9754		89		
1545-1563	CUCUGCCAAAGAUGUCAUCTsT	609	GAUGACAUCUUUGGCAGAGTsT	610	AD-9631		80		
1545-1563	cucuGccAAAGAuGucAucTsT	611	GAUGAcAUCUUUGGcAGAGTsT	612	AD-9757		78		
1580-1598	CUGAGGACCAGCGGGUACUTsT	613	AGUACCCGCGUGGCCUCACAGTsT	614	AD-9595	32	31		
1580-1598	cuGAGGAccAGcGGGuAcuTsT	615	AGuACCCGCGUGGCCUcAGTsT	616	AD-9721		87	70	
1581-1599	UGAGGACCAGCGGGUACUGTsT	617	CAGUACCCGCGUGGCCUCACATsT	618	AD-9544		68		
1581-1599	uGAGGAccAGcGGGuAcuGTsT	619	cAGuACCCGCGUGGCCUcATsT	620	AD-9670		67		
1666-1684	ACUGUAUGGUCAGCACACUTT	621	AGUGUGCUGAGCCAUACAGUTT	622	AD-15235			25	
1668-1686	UGUAUGGUCAGCACACUCGTT	623	CGAGUGUGCUGACCAUACATT	624	AD-15236			73	
1669-1687	GUAUGGUCAGCACACUCGGTT	625	CCGAGUGUGCUGACCAUACTT	626	AD-15168			100	
1697-1715	GGAUGGCCACAGCGUCGCTT	627	GCGACGGCUGUGGCCCAUCCTT	628	AD-15174			92	
1698-1716	GAUGGCCACAGCGUCGCCTT	629	GCGACGGCUGUGGCCCAUCCTT	630	AD-15325			81	

1806-1824	CAAGCUGGUGUCGGGGCCCTT	631	GGCCCGGCAGACACAGCUUGTT	632	AD-15326				65		
1815-1833	CUGCCGGGGCCACACAGCUTsT	633	AGCGUUGUGGGCCGGCAGTsT	634	AD-9570	35	42				
1815-1833	cuGccGGGcccAcAaGcuTsT	635	AGCGUUGUGGGCCGGGcAGTsT	636	AD-9696		77				
1816-1834	UGCCGGGGCCACACACGCUUsT	637	AAGCGUUGUGGGCCGGGcATsT	638	AD-9566		38				
1816-1834	uGccGGGcccAcAaGcuTsT	639	AAGCGUUGUGGGCCGGGcATsT	640	AD-9692		78				
1818-1836	CCGGGGCCACACACGCUUUUsT	641	AAAAGCGUUGUGGGCCGGTsT	642	AD-9532		100				
1818-1836	ccGGGcccAcAaGcuuuTsT	643	AAAAGCGUUGUGGGCCGGTsT	644	AD-9658		102				
1820-1838	GGGGCCACACACGCUUUUGTsT	645	CCAAAGCGUUGUGGGCCCTsT	646	AD-9549		50				
1820-1838	GGGcccAcAaGcuuuGGTsT	647	CcAAAAGCGUUGUGGGCCCTsT	648	AD-9675		78				
1840-1858	GGUGAGGGGUGUCUACGCCATsT	649	UGGCGUAGACACCCUCACCTsT	650	AD-9541		43				
1840-1858	GGUGAGGGGUGUCUAcGccATsT	651	UGGCGUAGACACCCUcACCTsT	652	AD-9667		73				
1843-1861	GAGGGUGUCUACGCCAUUGTsT	653	CAUUGGGUAGACACCCUCTsT	654	AD-9550		36				
1843-1861	GAGGGUGUCUAcGccAuUGTsT	655	cAAUGGGGUAAGAcACCCUCTsT	656	AD-9676		100				
1861-1879	GCCAGGUGUGCCUGCUACTsT	657	GUAGCAGGCAGCACCCUGGCTsT	658	AD-9571		27	32			
1861-1879	GccAGGUGUcGcuGcuAcTsT	659	GuAGcAGGcAGcACCCUGGCTsT	660	AD-9697		74	89			
1862-1880	CCAGGUGUGCCUGCUACCTsT	661	GGUAGCAGGCAGCACCCUGGTsT	662	AD-9572	47	53				
1862-1880	ccAGGUGUcGcuGcuAcTsT	663	GGuAGcAGGcAGcACCCUGGTsT	664	AD-9698		73				
2008-2026	ACCCACAAGCCCGCCUGUGCTT	665	GCACAGCGCGCUUGUGGGUTT	666	AD-15327				82		
2023-2041	GUUCUGAGGCCACGAGGUCTsT	667	GACCUUGUGGGCCUCAGCAGTsT	668	AD-9639		30	35			
2023-2041	GuGcuGAGGccAcGAGGucTsT	669	GACCUUGUGGGCCUcAGcACTsT	670	AD-9765		82	74			
2024-2042	UUCUGAGGCCACGAGGUcATsT	671	UGACCUUGUGGGCCUCAGcATsT	672	AD-9518		31	35		0,60	

2024-2042	UGCUGAGGCCACGAGGUCATsT	673	UGACCUUGGUGGCCUACGATsT	674	AD-9518							
2024-2042	uGcuGAGGccAcGAGGucATsT	675	UGACCUUGGUGGCCUcAGcATsT	676	AD-9644	35	37				2,60	
2024-2042	UlgCfuGfaGlgCfcAfcGfaGlgUfcATsT	677	p-uGfaCfcUfcGfuGlgCfcUfcAfcCfaTsT	678	AD-14672					26		
2024-2042	UIGCfUfGAGGcICfACfGAGGUICfATsT	679	UfGACfICfUfCfUfGfGfGfCfUfCfAGGCfATsT	680	AD-14682					27		
2024-2042	UgCuGagGcCcAcGagGcUcATsT	681	p-uGfaCfcUfcGfuGlgCfcUfcAfcCfaTsT	682	AD-14692					22		
2024-2042	UgCuGagGcCcAcGagGcUcATsT	683	UfGACfICfUfCfUfGfGfGfCfUfCfAGGCfATsT	684	AD-14702					19		
2024-2042	UlgCfuGfaGlgCfcAfcGfaGlgUfcATsT	685	UGACCUcGUggCCUcUcAGcATsT	686	AD-14712					25		
2024-2042	UIGCfUfGAGGcICfACfGAGGUICfATsT	687	UGACCUcGUggCCUcUcAGcATsT	688	AD-14722					18		
2024-2042	UgCuGagGcCcAcGagGcUcATsT	689	UGACCUcGUggCCUcUcAGcATsT	690	AD-14732					32		
2024-2042	GfuGfgUfcAfcCfGcCfcCfGfGfAfuGfTsT	691	p-cAfuCfcCfGfCfcCfGfCfuGfaCfcAfcTsT	692	AD-15078					86		
2024-2042	GUfGUfCfAGCfGcCfCfGGAUfGfTsT	693	CfAUfCfCfCfGcCfCfGfCfUfGACfCfACfTsT	694	AD-15088					97		
2024-2042	GufGgUcAgCgCcCgGgAuGfTsT	695	p-cAfuCfcCfGfCfcCfGfCfuGfaCfcAfcTsT	696	AD-15098					74		
2024-2042	GufGgUcAgCgCcCgGgAuGfTsT	697	CfAUfCfCfCfGcCfCfGfCfUfGACfCfACfTsT	698	AD-15108					67		
2024-2042	GfuGfgUfcAfcCfGcCfcCfGfGfAfuGfTsT	699	CAUCCcGgCgCUgACcAcTsT	700	AD-15118					76		
2024-2042	GUfGUfCfAGCfGcCfCfGGAUfGfTsT	701	CAUCCcGgCgCUgACcAcTsT	702	AD-15128					86		
2024-2042	GufGgUcAgCgCcCgGgAuGfTsT	703	CAUCCcGgCgCUgACcAcTsT	704	AD-15138					74		
2030-2048	GGCCACGAGGUCAGCCCAATT	705	UUGGGCUGACCUcUGGCGCTT	706	AD-15237					30		
2035-2053	CGAGGUCAGCCCAACCAGUfT	707	ACUGGUUGGGCUGACCUcUGT	708	AD-15287					30		
2039-2057	GUCAGCCCAACCAGUGCGUfT	709	ACGCACUGGUUGGGCUGACTT	710	AD-15238					36		
2041-2059	CAGCCCAACCAGUGCGUGGfT	711	CCACGCACUGGUUGGGCUGGfT	712	AD-15328					35		
2062-2080	CACAGGGAGGCCAGCAUCCTT	713	GGAUGCGGCCUCCUcUGGfT	714	AD-15399					47		

2072-2090	CCAGCAUCCACGCUUCCUGTsT	715	CAGGAAGCGUGGAUGCUGGTsT	716	AD-9582	37			
2072-2090	ccAGcAuuccAeGcuuccuGTsT	717	cAGGAAGCGUGGAUGCUGGTsT	718	AD-9708	81			
2118-2136	AGUCAAGGAGCAUGGAAUCTsT	719	GAUUCcAUGCUCCUUGACUTsT	720	AD-9545	31	43		
2118-2136	AGucAAGGAGcAuGGAaucTsT	721	GAUUCcAUGCUCCUUGACUTsT	722	AD-9671	15	33	2,50	
2118-2136	AfgUfcAfaGfgAfgCfaUfgGfaAfuCTTsT	723	p-gAfuUfcCfaUfgCfuCfcUfuGfaCfuTsT	724	AD-14674			16	
2118-2136	AGUICfAAGGAGCfAUfGGAAUfCTTsT	725	GAUfUfCfAUfGCUfUfCfUfUfGACfUfTsT	726	AD-14684			26	
2118-2136	AgUcAaGgAgCaUgGaaUcTsT	727	p-gAfuUfcCfaUfgCfuCfcUfuGfaCfuTsT	728	AD-14694			18	
2118-2136	AgUcAaGgAgCaUgGaaUcTsT	729	GAUfUfCfAUfGCUfUfCfUfUfGACfUfTsT	730	AD-14704			27	
2118-2136	AfgUfcAfaGfgAfgCfaUfgGfaAfuCTTsT	731	GAUUCcAUGCUCCUUGACUTsT	732	AD-14714			20	
2118-2136	AGUICfAAGGAGCfAUfGGAAUfCTTsT	733	GAUUCcAUGCUCCUUGACUTsT	734	AD-14724			18	
2118-2136	AgUcAaGgAgCaUgGaaUcTsT	735	GAUUCcAUGCUCCUUGACUTsT	736	AD-14734			18	
2118-2136	GfcGfgCfaCfcCfuCfaUfaGfgCfcUfTsT	737	p-aGfgCfcUfaUfgAfgGfgUfgCfcGfcTsT	738	AD-15080			29	
2118-2136	GCTGGCTACfCfCfUfCfAUfAGGCfCfUfTsT	739	AGGCfCfUfAUfGAGGGUfGCTCfCfTsT	740	AD-15090			23	
2118-2136	GcGgCaCcCuCaUaGgCcUfTsT	741	p-aGfgCfcUfaUfgAfgGfgUfgCfcGfcTsT	742	AD-15100			26	
2118-2136	GcGgCaCcCuCaUaGgCcUfTsT	743	AGGCfCfUfAUfGAGGGUfGCTCfCfTsT	744	AD-15110			23	
2118-2136	GfcGfgCfaCfcCfuCfaUfaGfgCfcUfTsT	745	AGGCCuaUgagGGUGCGcGcTsT	746	AD-15120			20	
2118-2136	GCTGGCTACfCfCfUfCfAUfAGGCfCfUfTsT	747	AGGCCuaUgagGGUGCGcGcTsT	748	AD-15130			20	
2118-2136	GcGgCaCcCuCaUaGgCcUfTsT	749	AGGCCuaUgagGGUGCGcGcTsT	750	AD-15140			19	
2122-2140	AAGGAGCAUGGAAUCCCGGTsT	751	CCGGGAUUCcAUGCUCCUUTsT	752	AD-9522	59			
2122-2140	AAGGAGcAuGGAAucccGGTsT	753	CCGGGAUUCcAUGCUCCUUTsT	754	AD-9648	78			
2123-2141	AGGAGCAUGGAAUCCCGGTsT	755	GCCGGGAUUCcAUGCUCCUUTsT	756	AD-9552	80			

2123-2141	AGGAGcAuGGAAUucccGGcTsT	757	GCCGGGAUUCaUGCUCUCUTsT	758	AD- 9678	76			
2125-2143	GAGCAUGGAAUCCCGGCCCTsT	759	GGCCGGGAUUCcAUGCUCUTsT	760	AD- 9618	90			
2125-2143	GAGcAuGGAAUucccGGccTsT	761	GGCCGGGAUUCcAUGCUCUTsT	762	AD- 9744	91			
2230-2248	GCCUACGCCGUAGACAAcATT	763	UGUUGUCUACGGCGUAGGCTT	764	AD- 15239		38		
2231-2249	CCUACGCCGUAGACAAcACTT	765	GUGUUGUCUACGGCGUAGGTT	766	AD- 15212		19		
2232-2250	CUACGCCGUAGACAAcACGTT	767	CGUGUUGUCUACGGCGUAGTT	768	AD- 15240		43		
2233-2251	UACGCCGUAGACAAcACGUTT	769	ACGUGUUGUCUACGGCGUATT	770	AD- 15177		59		
2235-2253	CGCCGUAGACAAcACGUGUTT	771	ACACGUGUUGUCUACGGCGTT	772	AD- 15179		13		
2236-2254	GCCGUAGACAAcACGUGGTT	773	CACACGUGUUGUCUACGGCTT	774	AD- 15180		15		
2237-2255	CCGUAGACAAcACGUGUGUTT	775	ACACACGUGUUGUCUACGGTT	776	AD- 15241		14		
2238-2256	CGUAGACAAcACGUGUGUATT	777	UACACACGUGUUGUCUACGTT	778	AD- 15268		42		
2240-2258	UAGACAAcACGUGUGUAGUTT	779	ACUACACACGUGUUGUCUATT	780	AD- 15242		21		
2241-2259	AGACAACACGUGUGUAGUCTT	781	GACUACACACGUGUUGUCUTT	782	AD- 15216		28		
2242-2260	GACAACACGUGUGUAGUCATT	783	UGACUACACACGUGUUGUCTT	784	AD- 15176		35		
2243-2261	ACAACACGUGUGUAGUCAGTT	785	CUGACUACACACGUGUUGUTT	786	AD- 15181		35		
2244-2262	CAACACGUGUGUAGUCAGGTT	787	CCUGACUACACACGUGUUGTT	788	AD- 15243		22		
2247-2265	CACGUGUGUAGUCAGGAGCTT	789	GCUCUGACUACACACGUGTT	790	AD- 15182		42		
2248-2266	ACGUGUGUAGUCAGGAGCCTT	791	GGCUCUGACUACACACGUTT	792	AD- 15244		31		
2249-2267	CGUGUGUAGUCAGGAGCGGTT	793	CGGCUCUGACUACACACGTT	794	AD- 15387		23		
2251-2269	UGUGUAGUCAGGAGCCGGGTT	795	CCCGGCUCCUGACUACACATT	796	AD- 15245		18		
2257-2275	GUCAGGAGCCGGACGUCATsT	797	UGACGUCCCGGCUCCUGACTsT	798	AD- 9555	34			

2257-2275	GucAGGAGccGGGAcGucATsT	799	UGACGUCCCGGCUCCUGACTsT	800	AD- 9681					
2258-2276	UCAGGAGCCCGGACGUCAGTsT	801	CUGACGUCCCGGCUCCUGATsT	802	AD- 9619	42	61			
2258-2276	ucAGGAGccGGGAcGucAGTsT	803	CUGACGUCCCGGCUCCUGATsT	804	AD- 9745		56			
2259-2277	CAGGAGCCCGGACGUCAGTsT	805	GCUGACGUCCCGGCUCCUGTsT	806	AD- 9620	44	77			
2259-2277	cAGGAGccGGGAcGucAGTsT	807	GCUGACGUCCCGGCUCCUGTsT	808	AD- 9746		89			
2263-2281	AGCCGGGACGUCAGACUATt	809	UAGUGCUGACGUCCCGGCUtT	810	AD- 15288			19		
2265-2283	CCGGGACGUCAGCACUACATt	811	UGUAGUGCUGACGUCCCGGtT	812	AD- 15246			16		
2303-2321	CCGUGACAGCCGUUGCCAUTt	813	AUGGCAACGGCUGUCACGGtT	814	AD- 15289			37		
2317-2335	GCCAUCUGUGCCGGAGCCTsT	815	GGCUCCGGACAGCAUGGCTsT	816	AD- 9324		59	67		
2375-2393	CCCAUCCACAGGAUGGGUGUTt	817	ACACCAUCCUGGGAUGGGtT	818	AD- 15329				103	
2377-2395	CAUCCACAGGAUGGGUGUCUTt	819	AGACACCAUCCUGGGAUGtT	820	AD- 15330				62	
2420-2438	AGCUUUAAAUGGUUCCGATt	821	UCGGAACCAUUUUAAAAGCUTt	822	AD- 15169				22	
2421-2439	GCUUUAAAUGGUUCCGACTt	823	GUCGGAACCAUUUUAAAAGCTt	824	AD- 15201				6	
2422-2440	CUUUAAAUGGUUCCGACUTt	825	AGUCGGAACCAUUUUAAAAGtT	826	AD- 15331				14	
2423-2441	UUUAAAUGGUUCCGACUUtT	827	AAGUCGGAACCAUUUUAAAtT	828	AD- 15190				47	
2424-2442	UUUAAAUGGUUCCGACUUGtT	829	CAAGUCGGAACCAUUUUAAAtT	830	AD- 15247				61	
2425-2443	UAAAUGGUUCCGACUUGUTt	831	ACAAGUCGGAACCAUUUUAtT	832	AD- 15248				22	
2426-2444	AAAUGGUUCCGACUUGUCTt	833	GACAAGUCGGAACCAUUUUtT	834	AD- 15175				45	
2427-2445	AAUUGGUUCCGACUUGUCCTt	835	GGACAAGUCGGAACCAUUUUtT	836	AD- 15249				51	
2428-2446	AUUGGUUCCGACUUGUCCCTt	837	GGGACAAGUCGGAACCAUUtT	838	AD- 15250				96	
2431-2449	GGUUCGACUUGUCCCUcUTt	839	AGAGGGACAAGUCGGAACCTt	840	AD- 15400				12	

2457-2475	CUCUAUGGCCUGGCACGAGTT	841	CUCUGCCAGGCCAUGGAGTT	842	AD-15332				22	
2459-2477	CCAUGGCCUGGCACGAGGTT	843	CCCUCUGCCAGGCCAUGGTT	844	AD-15388				30	
2545-2563	GAACUCACUCACUCUGGGUTT	845	ACCCAGAGUGAGUGAUUCTT	846	AD-15333				20	
2549-2567	UCACUCACUCUGGGUGCCUTT	847	AGGCACCAGAGUGAGUGATT	848	AD-15334				96	
2616-2634	UUUCACCAUUAACAACAGGUTT	849	ACCUUUUUGAAUGGUGAAATT	850	AD-15335				75	
2622-2640	CAUUAACAACAGGUCGAGCUTT	851	AGCUCGACCGUUUUGAAUGTT	852	AD-15183				16	
2623-2641	AUUAACAACAGGUCGAGCUGTT	853	CAGCUCGACCGUUUUGAAUUTT	854	AD-15202				41	
2624-2642	UUCAAAACAGGUCGAGCUGUTT	855	ACAGCUCGACCGUUUUGAAATT	856	AD-15203				39	
2625-2643	UCAAACAGGUCGAGCUGUGTT	857	CACAGCUCGACCGUUUUGATT	858	AD-15272				49	
2626-2644	CAAACAGGUCGAGCUGUGCTT	859	GCACAGCUCGACCGUUUUGTT	860	AD-15217				16	
2627-2645	AAACAGGUCGAGCUGUGCUTT	861	AGCACAGCUCGACCGUUUUTT	862	AD-15290				15	
2628-2646	AACAGGUCGAGCUGUGCUCTT	863	GAGCACAGCUCGACCGUGUUTT	864	AD-15218				13	
2630-2648	CAGGUCGAGCUGUGCUCGGTT	865	CCGAGCACAGCUCGACCGUUTT	866	AD-15389				13	
2631-2649	AGGUCGAGCUGUGCUCGGGTT	867	CCCAGCACAGCUCGACCGCUTT	868	AD-15336				40	
2633-2651	GUCGAGCUGUGCUCGGGUGTT	869	CACCCGAGCACAGCUCGACCTT	870	AD-15337				19	
2634-2652	UCGAGCUGUGCUCGGGUGCTT	871	GCACCCGAGCACAGCUCGATT	872	AD-15191				33	
2657-2675	AGCUGCUCCCAAUUGUGCCGTT	873	CGGCACAUUGGGAGCAGCUTT	874	AD-15390				25	
2658-2676	GCUGCUCCCAAUUGUGCCGATT	875	UCGGCACAUUGGGAGCAGCTT	876	AD-15338				9	
2660-2678	UGCUCCCCAAUUGCCCGAUGTT	877	CAUCGGCACAUUGGGAGCATT	878	AD-15204				33	
2663-2681	UCCCAAUUGCCCGAUGUCCTT	879	GGACAUCGGCACAUUGGGATT	880	AD-15251				76	
2665-2683	CCAAUGUGCCCGAUGUCCTT	881	ACGGACAUCGGCACAUUGGTT	882	AD-15205				14	

[illegible]

2743-2761	CaCcAaGgAgGcAgGaUuCTsT	925	p-gAfaUfcCfuGfcCfcUfuGfgUfgTsT	926	AD-14698				23	
2743-2761	CaCcAaGgAgGcAgGaUuCTsT	927	GAAUfCfCfUfGfCfCfUfCfCfUfUfGfGfUfGfTsT	928	AD-14708				14	
2743-2761	CfaCfcAfaGfGfAfgGfcAfgGfaUfuCfTsT	929	GAAUCcuGcuCCUUGgugTsT	930	AD-14718				31	
2743-2761	CFACfCfAAGGAGGCFAGGAUfUfCfTsT	931	GAAUCcuGcuCCUUGgugTsT	932	AD-14728				25	
2743-2761	CaCcAaGgAgGcAgGaUuCTsT	933	GAAUCcuGcuCCUUGgugTsT	934	AD-14738				31	
2743-2761	GfgCfcUfgGfaGfuUfuAfuUfcGfgATsT	935	p-uCfcGfaAfaAfaAfcUfcCfaGfgCfcTsT	936	AD-15084				19	
2743-2761	GGCfCfUfGfGAGUfUfUfUfUfCfGfTsT	937	UfCfCfGAUfAAACfUfCfCfAGGfCfCfTsT	938	AD-15094				11	
2743-2761	GgCclUgGaGuUuAuUcGgATsT	939	p-uCfcGfaAfaAfaAfcUfcCfaGfgCfcTsT	940	AD-15104				16	
2743-2761	GgCclUgGaGuUuAuUcGgATsT	941	UfCfCfGAUfAAACfUfCfCfAGGfCfCfTsT	942	AD-15114				15	
2743-2761	GfgCfcUfgGfaGfuUfuAfuUfcGfgATsT	943	UCCGAuuAAaeUCCAGgcccTsT	944	AD-15124				11	
2743-2761	GGCfCfUfGfGAGUfUfUfUfUfCfGfTsT	945	UCCGAuuAAaeUCCAGgcccTsT	946	AD-15134				12	
2743-2761	GgCclUgGaGuUuAuUcGgATsT	947	UCCGAuuAAaeUCCAGgcccTsT	948	AD-15144				9	
2753-2771	GCAGGAUUCUCCCAUGGATT	949	UCCAUGGGAAGAAUCCUUGCCTT	950	AD-15391				7	
2794-2812	UGCAGGGACAAACAUCGUUTT	951	AACGAUGUUUGUCCCUUGCATT	952	AD-15348				13	
2795-2813	GCAGGACAAACAUCGUUGTT	953	CAACGAUGUUUGUCCCUUGCCTT	954	AD-15349				8	
2797-2815	AGGGACAAACAUCGUUGGTT	955	CCCAACGAUGUUUGUCCCUUTT	956	AD-15170				40	
2841-2859	CCCUCAUCUCCAGCUAACUUTT	957	AGUUAGCUGGAGAGUAGGGTT	958	AD-15350				14	
2845-2863	CAUCCAGCUAACUGUGTT	959	CCACAGUUGCUGGAGAGUUTT	960	AD-15402				27	
2878-2896	GCUCUCUGAUUAAUGGAGGTT	961	CCUCCAUUAAUCAGGAGCCTT	962	AD-15293				27	
2881-2899	CCCUGAUUAUUGGAGGCUUTT	963	AAGCCUCCAUUAAUCAGGTT	964	AD-15351				14	
2882-2900	CCUGAUUAUUGGAGGCUUATT	965	UAAAGCCUCCAUUAAUCAGGTT	966	AD-15403				11	

2884-2902	UGAUUAAUUGGAGGCUUAGCTT	967	GCUAAGCCUCCAUUAAUCATT	968	AD-15404				38	
2885-2903	GAUUAUUGGAGGCUUAGCUTT	969	AGCUAAGCCUCCAUUAAUCCTT	970	AD-15207				15	
2886-2904	AUUAAUGGAGGCUUAGCUUTT	971	AAGCUAAGCCUCCAUUAAUUTT	972	AD-15352				23	
2887-2905	UUAAUUGGAGGCUUAGCUUUTT	973	AAAGCUAAGCCUCCAUUAAATT	974	AD-15255				31	
2903-2921	UUUCUGGAUGGCAUCUAGCTTsT	975	GCUAAGUCCCAUCCAGAAATsT	976	AD-9603		123			
2903-2921	uuuuGGAAuGGcAuuuAGcTsT	977	GCuAGAUgGcAuCCAGAAATsT	978	AD-9729		56			
2904-2922	UUUCUGGAUGGCAUCUAGCCTTsT	979	GGCUAAGUCCCAUCCAGAAATsT	980	AD-9599		139			
2904-2922	uuuuGGAAuGGcAuuuAGcTsT	981	GGCuAGAUgGcAuCCAGAAATsT	982	AD-9725		38			
2905-2923	UCUGGAUGGCAUCUAGCCATsT	983	UGGCUAAGUCCCAUCCAGATsT	984	AD-9621		77			
2905-2923	uuuGGAAuGGcAuuuAGcATsT	985	UGGCUAGAUgGcAuCCAGATsT	986	AD-9747		63			
2925-2943	AGGCUUGGAGACAGGUGGCGCTT	987	GCGCACCUUGUCUCCAGCCUTT	988	AD-15405				32	
2926-2944	GGCUGGAGACAGGUGGCGCCTT	989	GGCGCACCUUGUCUCCAGGCCTT	990	AD-15353				39	
2927-2945	GCUGGAGACAGGUGGCGCCCTT	991	GGCGCACCUUGUCUCCAGCCTT	992	AD-15354				49	
2972-2990	UUCUGAGGCCACCUUUUACUUTT	993	AGUAAAAGGUGGCUCAGGAATT	994	AD-15406				35	
2973-2991	UCCUGAGGCCACCUUUUACUCUTT	995	GAGUAAAAGGUGGCUCAGGATT	996	AD-15407				39	
2974-2992	CCUGAGGCCACCUUUUACUCUUTT	997	AGAGUAAAAGGUGGCUCAGGTT	998	AD-15355				18	
2976-2994	UGAGCCACCUUUUACUCUGCUTT	999	GCAGAGUAAAAGGUGGCUCATT	1000	AD-15356				50	
2978-2996	AGCCACCUUUUACUCUGCUCTT	1001	GAGCAGAGUAAAAGGUGGCUTT	1002	AD-15357				54	
2981-2999	CACCUUUUACUCUGCUCUAUUTT	1003	AUAGAGCAGAGUAAAAGGUGTT	1004	AD-15269				23	
2987-3005	UACUCUGCUCUAUGGCCAGGTsT	1005	CCUGGCAUAGAGCAGAGUATsT	1006	AD-9565		74			
2987-3005	uAuuuGcuuuAuGGcAGGTsT	1007	CCUGGcAuAGAGcAGAGuATsT	1008	AD-9691		49			

2998-3016	AUGCCAGGCUGUGCUAGCATT	1009	UGCUAGCACACCCUGGCAUUTT	1010	AD-15358				12	
3003-3021	AGGCUUGUCUAGCAACACCTT	1011	GGUGUUGCUAGCACAGCCUUTT	1012	AD-15359				24	
3006-3024	CUGUGCUAGCAACACCCAAATT	1013	UUGGGUGUUGCUAGCACAGTT	1014	AD-15360				13	
3010-3028	GCUAGCAACACCCAAAGGUTT	1015	ACCUUUGGGUGUUGCUAGCCTT	1016	AD-15219				19	
3038-3056	GGAGCCAUACCCUAGGACUUTT	1017	AGUCCUAGGUGAUGGCUCCCTT	1018	AD-15361				24	
3046-3064	CACCUAGGACUGACUCGGCTT	1019	GCCGAGUCAGUCCUAGGUGTT	1020	AD-15273				36	
3051-3069	AGGACUGACUCGGCAGUGUTT	1021	ACACUGCCGAGUCAGUCCUUTT	1022	AD-15362				31	
3052-3070	GGACUGACUCGGCAGUGUTT	1023	CACACUGCCGAGUCAGUCCCTT	1024	AD-15192				20	
3074-3092	UGGUGCAUGCACUGUCUCATT	1025	UGAGACAGUGCAUGCACCAATT	1026	AD-15256				19	
3080-3098	AUGCACUGUCUCAGCCAACTT	1027	GUUGGCUGAGACAGUGCAUUTT	1028	AD-15363				33	
3085-3103	CUGUCUCAGCCAAACCCGCUUTT	1029	AGCGGGUUGGCUGAGACAGTT	1030	AD-15364				24	
3089-3107	CUCAGCCAACCCGCUCCACTsT	1031	GUGGAGCGGGUUGGCUGAGTsT	1032	AD-9604	35	49			
3089-3107	cucAGccAAcccGcuccAcTsT	1033	GUGGAGCGGGUUGGCUGAGTsT	1034	AD-9730		85			
3093-3111	GCCAAACCCGCUCCACUACCTsT	1035	GGUAGUGGAGCGGGUUGGCTsT	1036	AD-9527		45			
3093-3111	GccAAcccGcuccActuAccTsT	1037	GGuAGUGGAGCGGGUUGGCTsT	1038	AD-9653		86			
3096-3114	AACCCGCUCCACUACCCCGGTT	1039	CCGGGUAGUGGAGCGGGUUTT	1040	AD-15365				62	
3099-3117	CCGCUCCACUACCCCGGCAGTT	1041	CUGCCGGGUAGUGGAGCGGTT	1042	AD-15294				30	
3107-3125	CUACCCGGCAGGGUACACATT	1043	UGUGUACCCUGCCGGGUAGTT	1044	AD-15173				12	
3108-3126	UACCCGGCAGGGUACACAUUTT	1045	AUGUGUACCCUGCCGGGUATT	1046	AD-15366				21	
3109-3127	ACCCGGCAGGGUACACAUUTT	1047	AAUGUGUACCCUGCCGGGUUTT	1048	AD-15367				11	
3110-3128	CCCGGCAGGGUACACAUUUCTT	1049	GAAUGUGUACCCUGCCGGGTT	1050	AD-15257				18	

3112-3130	CGCAGGGUACACAUUCGCTT	1051	GCGAAUGUGUACCCUGCCGTT	1052	AD-15184				50
3114-3132	GCAGGGUACACAUUCGCACTT	1053	GUGCGAAUGUGUACCCUGCTT	1054	AD-15185				12
3115-3133	CAGGGUACACAUUCGCACCTT	1055	GGUGCGAAUGUGUACCCUGTT	1056	AD-15258				73
3116-3134	AGGGUACACAUUCGCACCTT	1057	GGGUGCGAAUGUGUACCCUUTT	1058	AD-15186				36
3196-3214	GGAACUGAGCCAGAAACGCTT	1059	GCGUUUCUGGCUCAGUUCCTT	1060	AD-15274				19
3197-3215	GAACUGAGCCAGAAACGCATT	1061	UGCGUUUCUGGCUCAGUUCTT	1062	AD-15368				7
3198-3216	AACUGAGCCAGAAACGCAGTT	1063	CUGCGUUUCUGGCUCAGUUTT	1064	AD-15369				17
3201-3219	UGAGCCAGAAACGCAGAUUTT	1065	AAUCUGCGUUUCUGGCUCATT	1066	AD-15370				19
3207-3225	AGAAACGCAGAUUGGGUGTT	1067	CAGCCAAUCUGCGUUUCUUTT	1068	AD-15259				38
3210-3228	AACGCAGAUUGGGUGGCUTT	1069	AGCCAGCCAAUCUGCGUUTT	1070	AD-15408				52
3233-3251	AGCCAAAGCCUCUUCUUAUTsT	1071	AGUAAAGAGAGGCUUGGCUTsT	1072	AD-9597	23	21	0,04	
3233-3251	AGccAAAGccuuuuAcutTsT	1073	AGUAAAGAGAGGCUUGGCUTsT	1074	AD-9723	12	26		
3233-3251	AfgCfcAfaGfcCfuUfcUfaAfcUfTsT	1075	p-aGfuAfaGfaAfgAfgGfcUfuGfgCfuTsT	1076	AD-14680				15
3233-3251	AGCfcfAAAGCfcfcUfcUfUfcUfUfAcUfTsT	1077	AGUfAAAGAGAGGCUUfUGGCUfTsT	1078	AD-14690				18
3233-3251	AgCcAaGcCuCuUeUuAeUtsT	1079	p-aGfuAfaGfaAfgAfgGfcUfuGfgCfuTsT	1080	AD-14700				15
3233-3251	AgCcAaGcCuCuUeUuAeUtsT	1081	AGUfAAAGAGAGGCUUfUGGCUfTsT	1082	AD-14710				15
3233-3251	AfgCfcAfaGfcCfuUfcUfaAfcUfTsT	1083	AGUAAgaAGagGCUUUGgeuTsT	1084	AD-14720				18
3233-3251	AGCfcfAAAGCfcfcUfcUfUfcUfUfAcUfTsT	1085	AGUAAgaAGagGCUUUGgeuTsT	1086	AD-14730				18
3233-3251	AgCcAaGcCuCuUeUuAeUtsT	1087	AGUAAgaAGagGCUUUGgeuTsT	1088	AD-14740				17
3233-3251	UfgCfuUfcCfcUfgAfgGfaCfcAfgCfTsT	1089	p-gCfuGfgUfcCfuCfuGfgGfaAfcCfaTsT	1090	AD-15086				85
3233-3251	UfGGuUfCfcUfcUfGAGGACfcfAGCfTsT	1091	GCUfGGUfCfcUfcUfCfAGGGAACfcfTsT	1092	AD-15096				70

3233-3251	UgGnuUcCcUgAgGaCcAgCTsT	1093	P-gCfuGigUfcCfuCfuGigGfaAfcCfaTsT	1094	AD-15106				71	
3233-3251	UgGnuUcCcUgAgGaCcAgCTsT	1095	GCfUGGUfCfCfUfCfAGGGAAACfCfATsT	1096	AD-15116				73	
3233-3251	UfgGfuUfcCfcUfgAfgGfaCfaIgCfTsT	1097	GCUGGucCUcaGGGAaCcaTsT	1098	AD-15126				71	
3233-3251	UfCGUfUfCfCfUfUGAGGACfCfAGCfTsT	1099	GCUGGucCUcaGGGAaCcaTsT	1100	AD-15136				56	
3233-3251	UgGnuUcCcUgAgGaCcAgCTsT	1101	GCUGGucCUcaGGGAaCcaTsT	1102	AD-15146				72	
3242-3260	UCUUCUUACUUCACCCGGCTT	1103	GCCGGUGUAAGUAAGAAGATT	1104	AD-15260				79	
3243-3261	CUUCUUACUUCACCCGGCTT	1105	AGCCGGUGUAAGUAAGAAGATT	1106	AD-15371				24	
3244-3262	UUCUUACUUCACCCGGCTT	1107	CAGCCGGUGUAAGUAAGAAGATT	1108	AD-15372				52	
3262-3280	GGCUCUCCUAUUUUUACGGTT	1109	CCGUAAAAUAGAGGAGCCCTT	1110	AD-15172				27	
3263-3281	GGCUCUCCUAUUUUUACGGTT	1111	CCCGUAAAAUAGAGGAGCCCTT	1112	AD-15295				22	
3264-3282	GCUCUCCUAUUUUUACGGGUTT	1113	ACCCGUAAAAUAGAGGAGCTT	1114	AD-15373				11	
3265-3283	CUCCUCCUAUUUUUACGGGUAATT	1115	UACCCGUAAAAUAGAGGAGTT	1116	AD-15163				18	
3266-3284	UCCUCAUUUUUACGGGUAATT	1117	UUACCCGUAAAAUAGAGGATT	1118	AD-15165				13	
3267-3285	GCUCAUUUUUACGGGUAACCTT	1119	GUUACCCGUAAAAUAGAGGTT	1120	AD-15374				23	
3268-3286	CUCAUUUUUACGGGUAACATT	1121	UGUUACCCGUAAAAUAGAGTT	1122	AD-15296				13	
3270-3288	CAUUUUUACGGGUAACAGUUTT	1123	ACUGUUACCCGUAAAAUAGTT	1124	AD-15261				20	
3271-3289	AUUUUUACGGGUAACAGUUTT	1125	CACUGUUACCCGUAAAAUUTT	1126	AD-15375				90	
3274-3292	UUUACGGGUAACAGUAGGTT	1127	CCUCACUUUUACCCGUAAAAATT	1128	AD-15262				72	
3308-3326	CAGACCAGGAAGCUCGGUGTT	1129	CACCGAGCUUCCUGGUCUGTT	1130	AD-15376				14	
3310-3328	GACCAGGAAGCUCGGUGAGTT	1131	CUCACCGAGCUUCCUGGUCUTT	1132	AD-15377				19	
3312-3330	CCAGGAAGCUCGGUGAGUUTT	1133	CACUCACCGAGCUUCCUGGUTT	1134	AD-15409				17	

3315-3333	GGAAGCUCGGUGAGUGAUGTT	1135	CAUCACUCACCGAGCUUCCTT	1136	AD-15378				18		
3324-3342	GUGAGUGAUGGCAGAACGATT	1137	UCGUUCUGCCAUCACUCACTT	1138	AD-15410				8		
3326-3344	GAGUGAUGGCAGAACGAUGTT	1139	CAUGGUUCUGCCAUCACUCCTT	1140	AD-15379				11		
3330-3348	GAUGGCAGAACGAUGCCUGTT	1141	CAGGCAUCGUUCUGCCAUCCTT	1142	AD-15187				36		
3336-3354	AGAACGAUGCCUGCAGGCATT	1143	UGCCUGCAGGCAUCGUUCCTT	1144	AD-15263				18		
3339-3357	ACGAUGCCUGCAGGCAUGGTT	1145	CCAUGCCUGCAGGCAUCGUTT	1146	AD-15264				75		
3348-3366	GCAGGCAUGGAACUUUUUUCTT	1147	GAAAAAGUUCCAUGCCUGCTT	1148	AD-15297				21		
3356-3374	GGAACUUUUUCCCGUUUAUCATT	1149	UGAUAAACGGAAAAAGUUCCTT	1150	AD-15208				6		
3357-3375	GAACUUUUUCCCGUUUAUCACTT	1151	GUGAUAAACGGAAAAAGUUCTT	1152	AD-15209				28		
3358-3376	AACUUUUUCCCGUUUAUCACCTT	1153	GGUGAUAAACGGAAAAAGUUTT	1154	AD-15193				131		
3370-3388	UAUCACCCAGGCCUGAUUUCTT	1155	GAUACAGGCCUGGGUGAUATT	1156	AD-15380				88		
3378-3396	AGGCUGAUUACACUGGCCUTT	1157	AGGCCAGUGAAUCAGGCCUTT	1158	AD-15298				43		
3383-3401	UGAUUACACUGGCCUGGGGTT	1159	CCGCCAGGCCAGUGAAUACTT	1160	AD-15299				99		
3385-3403	AUUCACUGGCCUGGGCGGAGTT	1161	CUCCGCCAGGCCAGUGAAUUTT	1162	AD-15265				95		
3406-3424	GCUUCUAAAGGCAUGGUCGGTT	1163	CCGACCAUGCCUUAGAAGCTT	1164	AD-15381				18		
3407-3425	CUUCUAAAGGCAUGGUCGGGTT	1165	CCCGACCAUGCCUUAGAAGTT	1166	AD-15210				40		
3429-3447	GAGGCCAACAAACUGUCCCTT	1167	GGGACAGUUGUUGGCCUUCTT	1168	AD-15270				83		
3440-3458	ACUGUCCCUCCUUGAGCACTsT	1169	GUGCUCAAAGGAGGGACAGUTsT	1170	AD-9591	75	95				
3440-3458	AcuGuccuccuuGAGcAcTsT	1171	GUGCUCcAAGGAGGGAcAGUTsT	1172	AD-9717		105				
3441-3459	CUGUCCCUCCUUGAGCACCTsT	1173	GGUGCUCAAAGGAGGGACAGTsT	1174	AD-9622		94				
3441-3459	cuGuccuccuuGAGcAccTsT	1175	GGUGCUCcAAGGAGGGAcAGTsT	1176	AD-9748		103				

3480-3498	ACAUUUUAUCUUUUUGGUCUTsT	1177	AGACCCAAAAGAUAAAUGUTsT	1178	AD-9587	63	49		
3480-3498	AcAuuuAuccuuuuGGGucutTsT	1179	AGACCCAAAAGAUAAAUGUTsT	1180	AD-9713	22	25		
3480-3498	AfcAfuAfuAfuCfuUfuUfgGfgUfcUfTsT	1181	p-aGfAcfcCfaAfaAfaAfuAfuGfuTsT	1182	AD-14679		19		
3480-3498	AcFAUfUfUfAUfCfUfUfUfUfGGUfCfUfTsT	1183	AGACfCfCfAAAAAGAUfAAAUfGUfTsT	1184	AD-14689		24		
3480-3498	AcAuUuAuCuUuUjGgUcUfTsT	1185	p-aGfAcfcCfaAfaAfaAfuAfuGfuTsT	1186	AD-14699		19		
3480-3498	AcAuUuAuCuUuUjGgUcUfTsT	1187	AGACfCfCfAAAAAGAUfAAAUfGUfTsT	1188	AD-14709		21		
3480-3498	AfcAfuAfuAfuCfuUfuUfgGfgUfcUfTsT	1189	AGACCcAAAGAUAAAuAuguTsT	1190	AD-14719		24		
3480-3498	AcFAUfUfUfAUfCfUfUfUfUfGGUfCfUfTsT	1191	AGACCcAAAGAUAAAuAuguTsT	1192	AD-14729		23		
3480-3498	AcAuUuAuCuUuUjGgUcUfTsT	1193	AGACCcAAAGAUAAAuAuguTsT	1194	AD-14739		24		
3480-3498	GfcCfaUfcUfcGfcCfuGfcCfGfcGfcCfTsT	1195	p-gGfcUfcCfGfcAfgCfaGfaUfgGfcTsT	1196	AD-15085		74		
3480-3498	GCfCfAUfCfUfGfCfUfGfCfGfGAGfCfTsT	1197	GGCfUfCfCfGfCfAGfCfAGAUfGfCfTsT	1198	AD-15095		60		
3480-3498	GcCaUcUgCuGcGgGaGcTsT	1199	p-gGfcUfcCfGfcAfgCfaGfaUfgGfcTsT	1200	AD-15105		33		
3480-3498	GcCaUcUgCuGcGgGaGcTsT	1201	GGCfUfCfCfGfCfAGfCfAGAUfGfCfTsT	1202	AD-15115		30		
3480-3498	GfcCfaUfcUfcGfcCfuGfcCfGfcGfcCfTsT	1203	GGCUcAuGcAgCAGAUggeTsT	1204	AD-15125		54		
3480-3498	GCfCfAUfCfUfGfCfUfGfCfGfGAGfCfTsT	1205	GGCUcAuGcAgCAGAUggeTsT	1206	AD-15135		51		
3480-3498	GcCaUcUgCuGcGgGaGcTsT	1207	GGCUcAuGcAgCAGAUggeTsT	1208	AD-15145		49		
3481-3499	CAUUUAUCUUUUUGGUCUCUTsT	1209	CAGACCCAAAAGAUAAAUGTsT	1210	AD-9578	49	61		
3481-3499	cAuuuAuccuuuuGGGucutTsT	1211	cAGACCcAAAAAGAuAAAUGTsT	1212	AD-9704		111		
3485-3503	UAUCUUUUUGGUCUCUCUCUTsT	1213	AGGACAGACCCAAAAGAUATsT	1214	AD-9558		66		
3485-3503	uAuccuuuuGGGucutTsT	1215	AGGACAGACCCAAAAGAuATsT	1216	AD-9684		63		
3504-3522	CUCUGUUGCCUUUUUACAGTsT	1217	CUGUAAAAAGGCAACAGAGTsT	1218	AD-9634		29	30	

3504-3522	cuuGuuGcuuuuuAcaGtTsT	1219	CUGuAAAAAGGcAacAGAGtTsT	1220	AD-9760		14	27		
3512-3530	CCUUUUUACAGCCAACUUUtt	1221	AAAGUUGGCUGUAAAAAGGtT	1222	AD-15411				5	
3521-3539	AGCCAACUUUUCUAGACCUtt	1223	AGGUCUAGAAAAAGUUGGCUtt	1224	AD-15266				23	
3526-3544	ACUUUUUCUAGACCUUGUUUtt	1225	AAAACAGGUCUAGAAAAAGUtt	1226	AD-15382				12	
3530-3548	UUCUAGACCUUGUUUUGCUUtsT	1227	AAGCAAAACAGGUCUAGAAtsT	1228	AD-9554		23	24		
3530-3548	uuuuAGAccuGiuuuuGcuuTsT	1229	AAGcAAAAAcAGGUCuAGAAtsT	1230	AD-9680		12	22		0,10
3530-3548	UfuCfuAfgAfcGfuGfuUfuGfuUtsT	1231	p-aGfcfaAfaAfcAfgGfuCfuAfgAfaTsT	1232	AD-14676				12	
3530-3548	UfuUfuUfuAGACfcUfuUfuUfuUfuUtsT	1233	AAGCfAAAAACfAGGfUfUfUfAGAAtsT	1234	AD-14686				13	
3530-3548	UuCuAgAcCuGuUuUgCuUtsT	1235	p-aGfcfaAfaAfcAfgGfuCfuAfgAfaTsT	1236	AD-14696				12	
3530-3548	UuCuAgAcCuGuUuUgCuUtsT	1237	AAGCfAAAAACfAGGfUfUfUfAGAAtsT	1238	AD-14706				18	
3530-3548	UfuCfuAfgAfcGfuGfuUfuUfuUtsT	1239	AAGcAaaACagGUCUAgaaTsT	1240	AD-14716				17	
3530-3548	UfuUfuUfuAGACfcUfuUfuUfuUfuUtsT	1241	AAGcAaaACagGUCUAgaaTsT	1242	AD-14726				16	
3530-3548	UuCuAgAcCuGuUuUgCuUtsT	1243	AAGcAaaACagGUCUAgaaTsT	1244	AD-14736				9	
3530-3548	CfaUfcaGfcGfcUfgGfaGfuUfuAfuUtsT	1245	p-aAfuAfaAfeUfcCfaGfgCfcUfaUfgTsT	1246	AD-15082				27	
3530-3548	CfAUfAGGCfcUfGGAGUfUfUfUfUtsT	1247	AAUfAAAAcUfUfCfAGGcfcUfUfUfUtsT	1248	AD-15092				28	
3530-3548	CaUaGgCeUgGaGuUuAuUtsT	1249	p-aAfuAfaAfeUfcCfaGfgCfcUfaUfgTsT	1250	AD-15102				19	
3530-3548	CaUaGgCeUgGaGuUuAuUtsT	1251	AAUfAAAAcUfUfCfAGGcfcUfUfUfUtsT	1252	AD-15112				17	
3530-3548	CfaUfcaGfcGfcUfgGfaGfuUfuAfuUtsT	1253	AAUAAacUCaaGGCCUaugTsT	1254	AD-15122				56	
3530-3548	CfAUfAGGCfcUfGGAGUfUfUfUfUtsT	1255	AAUAAacUCaaGGCCUaugTsT	1256	AD-15132				39	
3530-3548	CaUaGgCeUgGaGuUuAuUtsT	1257	AAUAAacUCaaGGCCUaugTsT	1258	AD-15142				46	
3531-3549	UCUAGACCUUGUUUUGCUUtsT	1259	AAAGCAAAACAGGUCUAGAtTsT	1260	AD-9553		27	22		0,02

3531-3549	ucuAGAccuGuuuuGuuuTtT	1261	AAAGcAAAAcAGGUCuAGATtT	1262	AD-9679	17	21		
3531-3549	UfcUfaGfaCfcUfgUfuUfuGfcUfuUfTtT	1263	p-aUfaGfaAfaAfaCfaGfgUfcUfaGfaTtT	1264	AD-14675			11	
3531-3549	UfCfUfAGACfCfUfGfUfUfUfUfUfUfUfUfTtT	1265	AAAGCfAAAAcAGGUCfUfUfAGATtT	1266	AD-14685			19	
3531-3549	UcUaGaCcUgUuuUuuGcUuUfTtT	1267	p-aUfaGfaAfaAfaCfaGfgUfcUfaGfaTtT	1268	AD-14695			12	
3531-3549	UcUaGaCcUgUuuUuuGcUuUfTtT	1269	AAAGCfAAAAcAGGUCfUfUfAGATtT	1270	AD-14705			16	
3531-3549	UfcUfaGfaCfcUfgUfuUfuGfcUfuUfTtT	1271	AAAGCaaAAcAGGUCUagaTtT	1272	AD-14715			19	
3531-3549	UfCfUfAGACfCfUfGfUfUfUfUfUfUfUfUfTtT	1273	AAAGCaaAAcAGGUCUagaTtT	1274	AD-14725			19	
3531-3549	UcUaGaCcUgUuuUuuGcUuUfTtT	1275	AAAGCaaAAcAGGUCUagaTtT	1276	AD-14735			19	
3531-3549	UfcAfuAfgGfcCfcUfgUfuUfuUfUfUfTtT	1277	p-aUfaAfaCfcAfgGfcCfcUfuGfaTtT	1278	AD-15081			30	
3531-3549	UfCfUfAGGfCfCfUfGfGAGUfUfUfUfUfUfTtT	1279	AUfAAAcUfCfCfAGGfCfUfUfUfUfUfUfTtT	1280	AD-15091			16	
3531-3549	UcAuAgGcCuGgAgUuuUuUfTtT	1281	p-aUfaAfaCfcAfgGfcCfcUfuGfaTtT	1282	AD-15101			16	
3531-3549	UcAuAgGcCuGgAgUuuUuUfTtT	1283	AUfAAAcUfCfCfAGGfCfUfUfUfUfUfUfTtT	1284	AD-15111			11	
3531-3549	UfcAfuAfgGfcCfcUfgUfuUfuUfUfUfTtT	1285	AUAAAcuCCagGCCUaUagaTtT	1286	AD-15121			19	
3531-3549	UfCfUfAGGfCfCfUfGfGAGUfUfUfUfUfUfTtT	1287	AUAAAcuCCagGCCUaUagaTtT	1288	AD-15131			17	
3531-3549	UcAuAgGcCuGgAgUuuUuUfTtT	1289	AUAAAcuCCagGCCUaUagaTtT	1290	AD-15141			18	
3557-3575	UGAAGAUUUUUAUUCUGGGTtT	1291	CCCAGAAUAAAUUCUUCATtT	1292	AD-9626	97	68		
3557-3575	uGAAGAUuuuAuucUGGGTtT	1293	CCcAGAAuAAuAUcUUCATtT	1294	AD-9752	28	33		
3570-3588	UCUGGGUUUUUGUAGCAUUUfTtT	1295	AAAUcUACAAACCCAGATtT	1296	AD-9629	23	24		
3570-3588	ucuGGGuuuuGuAGcAuuuTtT	1297	AAAUcUcAAAAcCCcAGATtT	1298	AD-9755	28	29		
3613-3631	AUAAAAACAAACAAACGUUfTtT	1299	AACGUUUUUUGUUUUUAUfTtT	1300	AD-15412			21	
3617-3635	AAACAAACAAACGUUGUCfTtT	1301	GGACAAcGUUUUGUUUUUAUfTtT	1302	AD-15211			73	

3618-3636	AACAAACAACGUGUCCUTT	1303	AGGACAACGUGUUGUUTT	1304	AD-15300			41	
-----------	---------------------	------	--------------------	------	----------	--	--	----	--

¹ U, C, A, G: ribonucleótido correspondiente; T: desoxitimidina; u, c, a, g: ribonucleótido 2'-O-metilo correspondiente: Uf, Cf, Af, Gf. ribonucleótido 2'-desoxi-2'-flúor correspondiente; cuando los nucleótidos se escriben en la secuencia, están conectados mediante grupos 3'-5' fosfodiéster; los nucleótidos con "s" agregada están conectados por grupos 3'-O-5'-O fosforotiodiéster; a menos que se indique por el prefijo "p", los oligonucleótidos carecen de un grupo 5'-fosfato en el nucleótido más hacia el extremo 5'; todos los oligonucleótidos llevan 3'-OH en el nucleótido más hacia el extremo 3'.

Tabla 2

Número de dúplex	Secuencia de hebra sentido (5'-3')	SEQ ID NO:	Secuencia de hebra antisentido (5'-3')	SEQ ID NO:	ARNm restante en el % de controles a conc. de ARNm de 30 nM
AD-10792	GccuGGA GuuuAuucGGAAATsT	1305	UUCCGAAuAAAACUcAGGCTsT	1306	15
AD-10793	GccuGGA GuuuAuucGGAAATsT	1307	uUcCGAAuAAAACUcAGGCTsT	1308	32
AD-10796	GccuGGA GuuuAuucGGAAATsT	1309	UUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1310	13
AD-12038	GccuGGA GuuuAuucGGAAATsT	1311	uUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1312	13
AD-12039	GccuGGA GuuuAuucGGAAATsT	1313	UuCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1314	29
AD-12040	GccuGGA GuuuAuucGGAAATsT	1315	UUcCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1316	10
AD-12041	GccuGGA GuuuAuucGGAAATsT	1317	UUcGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1318	11
AD-12042	GCCUGGAGUUUAUUCGGAATsT	1319	uUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1320	12
AD-12043	GCCUGGAGUUUAUUCGGAATsT	1321	UuCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1322	13
AD-12044	GCCUGGAGUUUAUUCGGAATsT	1323	UUcCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1324	7
AD-12045	GCCUGGAGUUUAUUCGGAATsT	1325	UUcGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1326	8
AD-12046	GccuGGA GuuuAuucGGAA	1327	UUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1328	13
AD-12047	GccuGGA GuuuAuucGGAAA	1329	UUUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1330	17
AD-12048	GccuGGA GuuuAuucGGAAAA	1331	UUUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1332	43
AD-12049	GccuGGA GuuuAuucGGAAAAAG	1333	CUUUUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1334	34
AD-12050	GccuGGA GuuuAuucGGAAATTab	1335	UUCCGAAUAAAACUCCAGGCTTab	1336	16
AD-12051	GccuGGA GuuuAuucGGAAATTab	1337	UUUCCGAAUAAAACUCCAGGCTTab	1338	31
AD-12052	GccuGGA GuuuAuucGGAAATTab	1339	UUUCCGAAUAAAACUCCAGGCTTab	1340	81
AD-12053	GccuGGA GuuuAuucGGAAATTab	1341	CUUUUCCGAAUAAAACUCCAGGCTTab	1342	46
AD-12054	GCCUGGAGUUUAUUCGGAATsT	1343	UUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1344	8
AD-12055	GccuGGA GuuuAuucGGAAATsT	1345	UUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1346	13
AD-12056	GcCuGgAgUuUaUuUcGgGaa	1347	UUCCGAAUAAAACUCCAGGCTTab	1348	11
AD-12057	GcCuGgAgUuUaUuUcGgGaa	1349	UUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1350	8
AD-12058	GcCuGgAgUuUaUuUcGgGaa	1351	UUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1352	9
AD-12059	GcCuGgAgUuUaUuUcGgGaa	1353	uUcCGAAuAAAACUcAGGCTsT	1354	23
AD-12060	GcCuGgAgUuUaUuUcGgGaa	1355	UUCCGAAUAAAACUCCAGGCTsT	1356	10

AD-12061	GcCuGgnAgUuUaUuCgGaATsT	1357	UUCCGaaUAaaCUCCAGgcTsT	1358	7
AD-12062	GcCuGgAgUuUaUuCgGaATTTab	1359	UUCCGaaUAaaCUCCAGgcTTTab	1360	10
AD-12063	GcCuGgAgUuUaUuCgGaA	1361	UUCCGaaUAaaCUCCAGgcscsu	1362	19
AD-12064	GcCuGgnAgUuUaUuCgGaATsT	1363	UUCCGAauAAACUCcAGGCTsT	1364	15
AD-12065	GcCuGgAgUuUaUuCgGaATTTab	1365	UUCCGAauAAACUCcAGGCTTTab	1366	16
AD-12066	GcCuGgAgUuUaUuCgGaA	1367	UUCCGAauAAACUCcAGGCscsu	1368	20
AD-12067	GcCuGgnAgUuUaUuCgGaATsT	1369	UUCCGAUAAAAAUCCAGGCTsT	1370	17
AD-12068	GcCuGgAgUuUaUuCgGaATTTab	1371	UUCCGAUAAAAAUCCAGGCTTTab	1372	18
AD-12069	GcCuGgAgUuUaUuCgGaA	1373	UUCCGAUAAAAAUCCAGGCscsu	1374	13
AD-12338	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfAf	1375	P-uUfcCfGafUfaAfaCfuCfcAfgGfc	1376	15
AD-12339	GcCuGgAgUuUaUuCgGaA	1377	P-uUfcCfGafUfaAfaCfuCfcAfgGfc	1378	14
AD-12340	GccuGGAGuuuAuucGGAA	1379	P-uUfcCfGafUfaAfaCfuCfcAfgGfc	1380	19
AD-12341	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfAfTsT	1381	P-uUfcCfGafUfaAfaCfuCfcAfgGfcTsT	1382	12
AD-12342	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfAfTsT	1383	UUCCGAUuAAAAUCcAGGCTsT	1384	13
AD-12343	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfAfTsT	1385	uUcCGAAuAAACUccAGGCTsT	1386	24
AD-12344	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfAfTsT	1387	UUCCGAUAAAAAUCCAGGCTsT	1388	9
AD-12345	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfAfTsT	1389	UUCCGAUAAAAAUCCAGGCscsu	1390	12
AD-12346	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfAfTsT	1391	UUCCGaaUAaaCUCCAGgcscsu	1392	13
AD-12347	GCCUGGAGUUUAUUCGGAAATsT	1393	P-uUfcCfGafUfaAfaCfuCfcAfgGfcTsT	1394	11
AD-12348	GccuGGAGuuuAuucGGAAATsT	1395	P-uUfcCfGafUfaAfaCfuCfcAfgGfcTsT	1396	8
AD-12349	GcCuGgnAgUuUaUuCgGaATsT	1397	P-uUfcCfGafUfaAfaCfuCfcAfgGfcTsT	1398	11
AD-12350	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfGfaATTTab	1399	P-uUfcCfGafUfaAfaCfuCfcAfgGfcTTTab	1400	17
AD-12351	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfGfaAf	1401	P-uUfcCfGafUfaAfaCfuCfcAfgGfesCfsu	1402	11
AD-12352	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfGfaAf	1403	UUCCGaaUAaaCUCCAGgcscsu	1404	11
AD-12354	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfGfaAf	1405	UUCCGAUAAAAAUCCAGGCscsu	1406	11
AD-12355	GfcCfuGfgAfGufUfaUfuCfGgfGfaAf	1407	UUCCGAUAAAAAUCCAGGCTsT	1408	9

AD-12356	GfcCfuGfgAfgUfuUfaUfuCfGgGfaAf	1409	uUcCGAAuAAACUccAGGCTsT	1410	25
AD-12357	GmocCmouGmogAm02gUmouUmoaUmouCmogGmoaA	1411	UUCCGaaUAaaCUCCAggc	1412	56
AD-12358	GmocCmouGmogAm02gUmouUmoaUmouCmogGmoaA	1413	P-uUfcCfGfAfaUfaAfaCfuCfcAfgGfc	1414	29
AD-12359	GmocCmouGmogAm02gUmouUmoaUmouCmogGmoaA	1415	P-uUfcCfGfAfaUfaAfaCfuCfcAfgGfcsCfsu	1416	30
AD-12360	GmocCmouGmogAm02gUmouUmoaUmouCmogGmoaA	1417	UUCCGAAUAAACUCCAGGCscsu	1418	15
AD-12361	GmocCmouGmogAm02gUmouUmoaUmouCmogGmoaA	1419	UUCCGAAuAAACUCCAGGCTsT	1420	20
AD-12362	GmocCmouGmogAm02gUmouUmoaUmouCmogGmoaA	1421	uUcCGAAuAAACUccAGGCTsT	1422	51
AD-12363	GmocCmouGmogAm02gUmouUmoaUmouCmogGmoaA	1423	UUCCGaaUAaaCUCCAggcscsu	1424	11
AD-12364	GmocCmouGmogAmogUmouUmoaUmouCmogGmoaATsT	1425	UUCCGaaUAaaCUCCAggcTsT	1426	25
AD-12365	GmocCmouGmogAmogUmouUmoaUmouCmogGmoaATsT	1427	UUCCGAAuAAACUCCAGGCTsT	1428	18
AD-12366	GmocCmouGmogAmogUmouUmoaUmouCmogGmoaATsT	1429	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	1430	23
AD-12367	GmocmocmouGGA GmoumoumouAmoumoumoucGGAAATsT	1431	UUCCGaaUAaaCUCCAggcTsT	1432	42
AD-12368	GmocmocmouGGA GmoumoumouAmoumoumoucGGAAATsT	1433	UUCCGAAuAAACUCcAGGCTsT	1434	40
AD-12369	GmocmocmouGGA GmoumoumouAmoumoumoucGGAAATsT	1435	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	1436	26
AD-12370	GmocmocmouGGA GmoumoumouAmoumoumoucGGAAATsT	1437	P-UfUfCfCfGAAUfaAAcUfCfCfAGGCTTsT	1438	68
AD-12371	GmocmocmouGGA GmoumoumouAmoumoumoucGGAAATsT	1439	P-UfUfCfCfGAAUfaAAcUfCfCfAGGcCfsUf	1440	60
AD-12372	GmocmocmouGGA GmoumoumouAmoumoumoucGGAAATsT	1441	P-uUfcCfGfAfaUfaAfaCfuCfcAfgGfcsCfsu	1442	60
AD-12373	GmocmocmouGGA GmoumoumouAmoumoumoucGGAAATsT	1443	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	1444	55
AD-12374	GCfCfUfGGAGUfUfUfaUfUfCfGGAATsT	1445	UfUfCfCfGAAUfaAAcUfCfCfAGGCTTsT	1446	9
AD-12375	GCfCfUfGGAGUfUfUfaUfUfCfGGAATsT	1447	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	1448	16
AD-12377	GCfCfUfGGAGUfUfUfaUfUfCfGGAATsT	1449	uUcCGAAuAAACUccAGGCTsT	1450	88
AD-12378	GCfCfUfGGAGUfUfUfaUfUfCfGGAATsT	1451	UUCCGaaUAaaCUCCAggcscsu	1452	6
AD-12379	GCfCfUfGGAGUfUfUfaUfUfCfGGAATsT	1453	UUCCGAAUAAACUCCAGGCscsu	1454	6
AD-12380	GCfCfUfGGAGUfUfUfaUfUfCfGGAATsT	1455	P-uUfcCfGfAfaUfaAfaCfuCfcAfgGfcsCfsu	1456	8
AD-12381	GCfCfUfGGAGUfUfUfaUfUfCfGGAATsT	1457	P-uUfcCfGfAfaUfaAfaCfuCfcAfgGfcTsT	1458	10
AD-12382	GCfCfUfGGAGUfUfUfaUfUfCfGGAATsT	1459	P-UfUfCfCfGAAUfaAAcUfCfCfAGGCTTsT	1460	7

AD-12383	GCCUGGAGUUUAUUCGGAATsT	1461	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsT	1462	7
AD-12384	GccuGGA GUuuAuuC GGAATsT	1463	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsT	1464	8
AD-12385	GcCuGgnAgUuUaUuUcGgGaaTsT	1465	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsT	1466	8
AD-12386	GfcCfuGfgAfgUfuUfaUfuCfGfGaaF	1467	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsT	1468	11
AD-12387	GCfCfUfGGA GGUfUfUfUfUfUfCfGAA	1469	UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1470	13
AD-12388	GCfCfUfGGA GGUfUfUfUfUfUfCfGAA	1471	P-uUfCfCfGafUfaAfaCfuCfCfAfGfGfc	1472	19
AD-12389	GCfCfUfGGA GGUfUfUfUfUfUfCfGAA	1473	P-uUfCfCfGafUfaAfaCfuCfCfAfGfGfCfsUf	1474	16
AD-12390	GCfCfUfGGA GGUfUfUfUfUfUfCfGAA	1475	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTscsu	1476	17
AD-12391	GCfCfUfGGA GGUfUfUfUfUfUfCfGAA	1477	UUCCGaaUAaaCUCCAggc	1478	21
AD-12392	GCfCfUfGGA GGUfUfUfUfUfUfCfGAA	1479	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	1480	28
AD-12393	GCfCfUfGGA GGUfUfUfUfUfUfCfGAA	1481	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	1482	17
AD-12394	GCfCfUfGGA GGUfUfUfUfUfUfCfGAA	1483	uUcCGAAuAAACUccAGGCTsT	1484	75
AD-12395	GmccCmouGmogA mogUmoouUmoouCmogGmoaATsT	1485	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1486	55
AD-12396	GmccCmouGmogAm02gUmoouUmoouCmogGmoaA	1487	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1488	59
AD-12397	GfcCfuGfgAfgUfuUfaUfuCfGfGaaF	1489	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1490	20
AD-12398	GfcCfuGfgAfgUfuUfaUfuCfGfGaaATsT	1491	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1492	11
AD-12399	GcCuGgnAgUuUaUuUcGgGaaTsT	1493	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1494	13
AD-12400	GCCUGGAGUUUAUUCGGAATsT	1495	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1496	12
AD-12401	GccuGGA GUuuAuuC GGAATsT	1497	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1498	13
AD-12402	GccuGGA GUuuAuuC GGA	1499	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1500	14
AD-12403	GCfCfUfGGA GGUfUfUfUfUfUfCfGAA	1501	P-UfUfCfCfGAAUFAAAACfUfCfCfAGGCTsCfsUf	1502	4
AD-9314	GCCUGGAGUUUAUUCGGAATsT	1503	UUCCGAAUAAACUCCAGGCTsT	1504	9

¹ U, C, A, G: ribonucleótido correspondiente; T: desoxitimidina; u, c, a, g: ribonucleótido 2'-O-metil correspondiente; Uf, Cf, Af, Gf: ribonucleótido 2'-desoxi-2'-flúor correspondiente; moc, mou, mog, moa: nucleótido 2'-MOE correspondiente; cuando los nucleótidos se escriben en la secuencia, están conectados mediante grupos 3'-5' fosfodiéster; ab: nucleótido abásico 3'-terminal; nucleótidos con "s" agregada están conectados por grupos 3'-O-5'-O fosforodiéster; a menos que se indique por el prefijo "p", los oligonucleótidos carecen de un grupo 5'-fosfato en el nucleótido más hacia el extremo 5'; todos los oligonucleótidos llevan 3'-OH en el nucleótido más hacia el extremo 3'.

Se describen además los siguientes puntos:

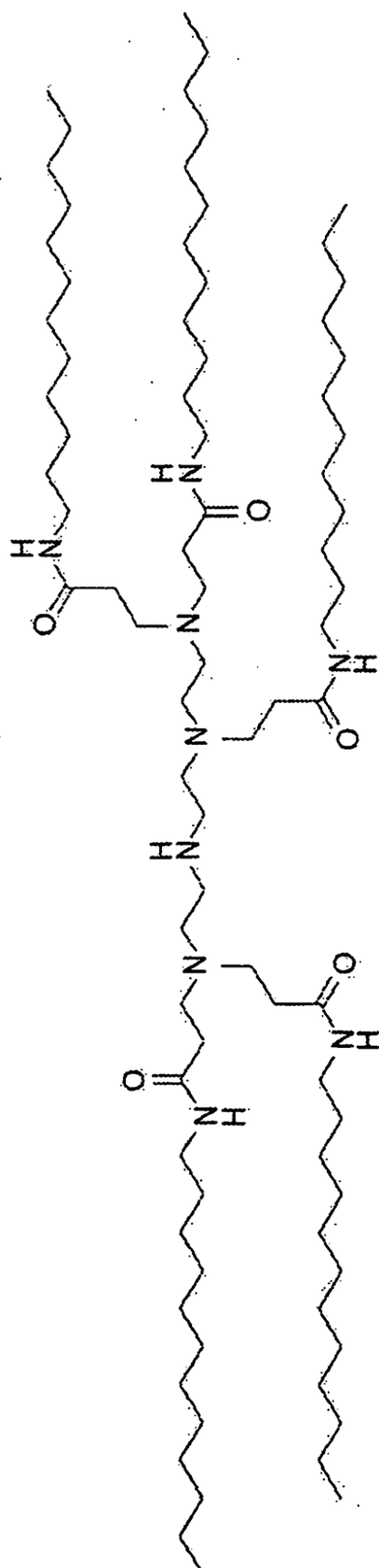
- 5 1. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de un gen PCSK9 humano en una célula, comprendiendo dicho ARNbc al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en el que una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a al menos una parte de un

ARNm que codifica para PCSK9, y en el que dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud e inhibiendo dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho PCSK9, la expresión de dicho gen PCSK9.

- 5 2. El ARNbc según el punto 1, en el que dicha primera secuencia se selecciona del grupo que consiste en las tablas 1 y 2 y dicha segunda secuencia se selecciona del grupo que consiste en las tablas 1 y 2.
3. El ARNbc según el punto 1, comprendiendo dicho ARNbc al menos un nucleótido modificado.
- 10 4. El ARNbc según el punto 2, comprendiendo dicho ARNbc al menos un nucleótido modificado.
5. El ARNbc según el punto 3, en el que dicho nucleótido modificado se elige del grupo de: un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterol o grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico.
- 15 6. El ARNbc según el punto 3, en el que dicho nucleótido modificado se elige del grupo de: un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-flúor, un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, nucleótido modificado con 2'-amino, nucleótido modificado con 2'-alquilo, nucleótido de morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

REIVINDICACIONES

1. Ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de un gen PCSK9 humano en una célula, comprendiendo dicho ARNbc al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en el que una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda secuencia que comprende una región de complementariedad que es completamente complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica para PCSK9, y en el que dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud e inhibiendo dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho PCSK9, la expresión de dicho gen PCSK9, en el que:
 - (a) dicha primera secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 1229 y dicha segunda secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 1230; o
 - (b) dicha primera secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 1227 y dicha segunda secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 1228.
2. ARNbc según la reivindicación 1, comprendiendo dicho ARNbc al menos un nucleótido modificado.
3. ARNbc según la reivindicación 2, en el que dicho nucleótido modificado se elige del grupo de un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico, un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-flúor, un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, nucleótido modificado con 2'-amino, nucleótido modificado con 2'-alquilo, nucleótido de morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.
4. Composición farmacéutica para inhibir la expresión del gen PCSK9 en un organismo, que comprende un ARNbc y un portador farmacéuticamente aceptable, en la que el ARNbc es según la reivindicación 1.
5. Método *in vitro* para inhibir la expresión del gen PCSK9 en una célula, comprendiendo el método:
 - (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), siendo el ARNbc tal como se define en la reivindicación 1; y
 - (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen PCSK9, inhibiendo de ese modo la expresión del gen PCSK9 en la célula.
6. ARNbc para tratar, prevenir o gestionar procesos patológicos que pueden mediar mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9, siendo el ARNbc según la reivindicación 1.
7. Vector para inhibir la expresión del gen PCSK9 en una célula, comprendiendo dicho vector una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica para al menos una hebra de un ARNbc, en el que dicho ARNbc es según la reivindicación 1.
8. Célula aislada que comprende el ARNbc según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el vector según la reivindicación 7.
9. Ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para reducir el nivel de expresión de un gen PCSK9 humano en una célula, siendo dicho ARNbc según la reivindicación 1.
10. ARNbc según la reivindicación 9, en el que dicho contacto reduce el nivel de expresión de dicho gen PCSK9.
11. ARNbc según la reivindicación 9, en el que dicho contacto se realiza *in vitro* a 30 nM o menos.
12. Composición farmacéutica para reducir el nivel de expresión del gen PCSK9 en un organismo, que comprende el ARNbc según la reivindicación 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.
13. ARNbc según la reivindicación 9, para tratar un trastorno asociado a PCSK9.
14. ARNbc según la reivindicación 13, en el que dicho trastorno asociado a PCSK9 es hiperlipidemia.



ND98 Isómero I

FIG. 1

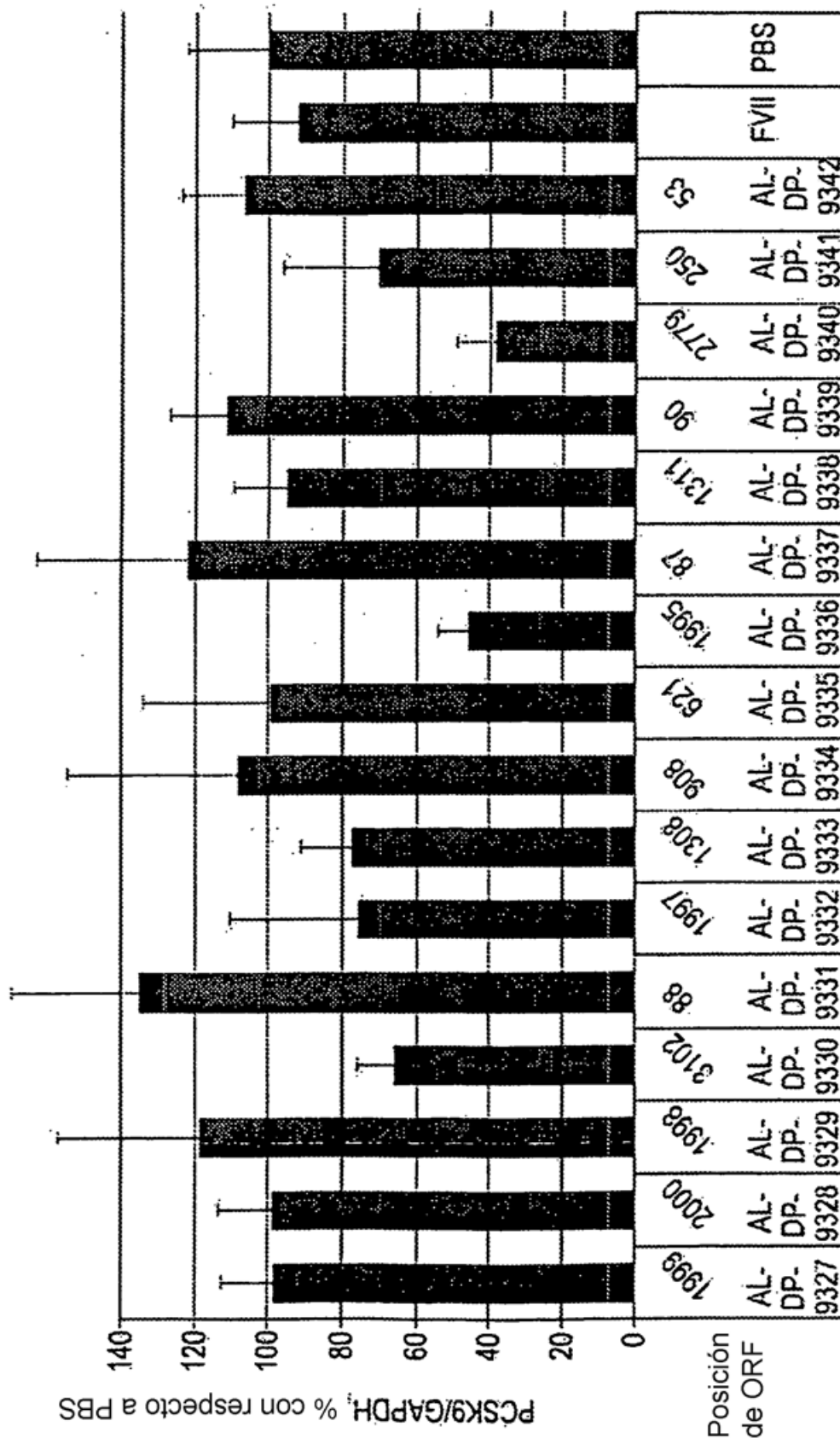


FIG. 2

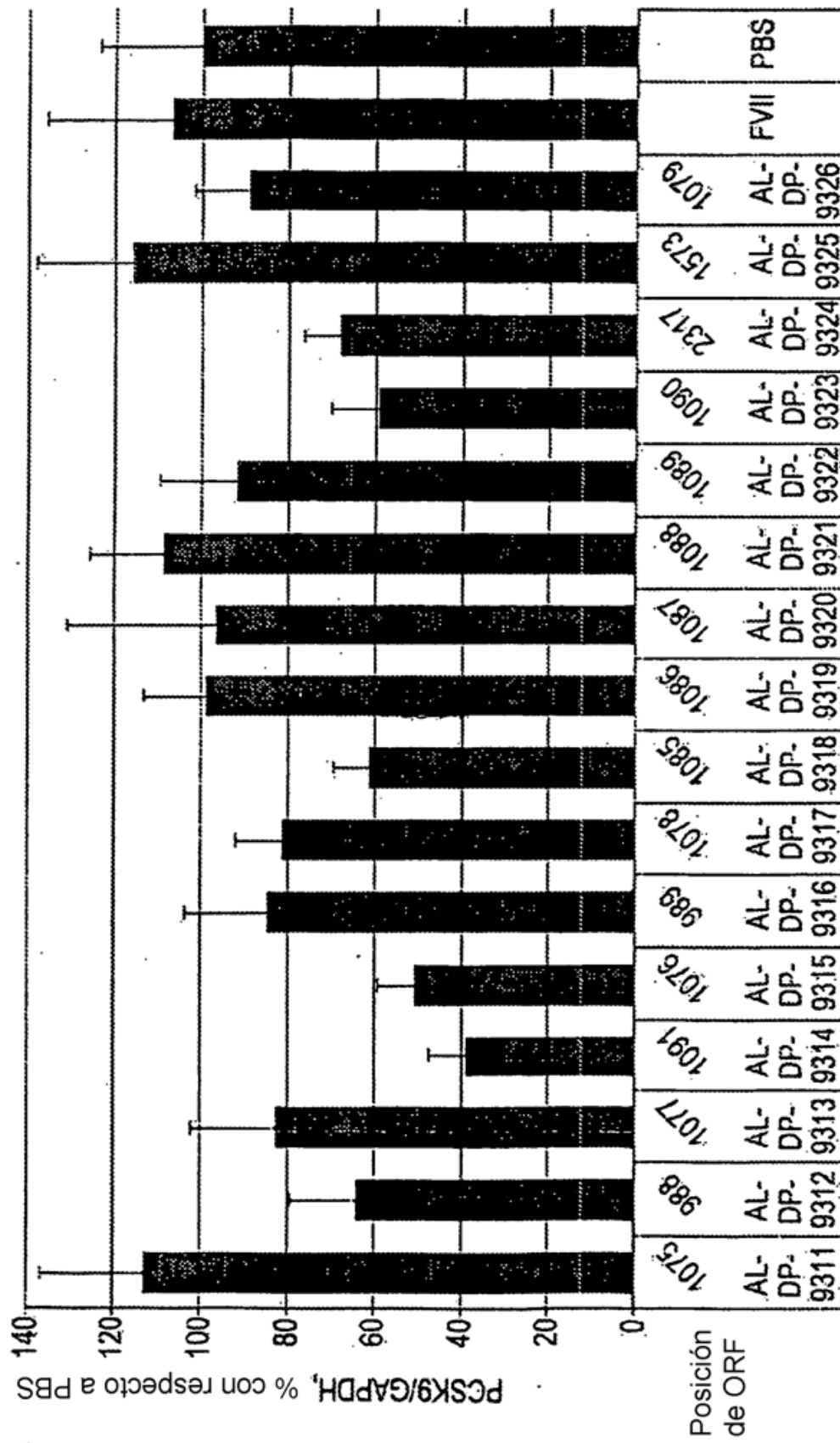


FIG. 3

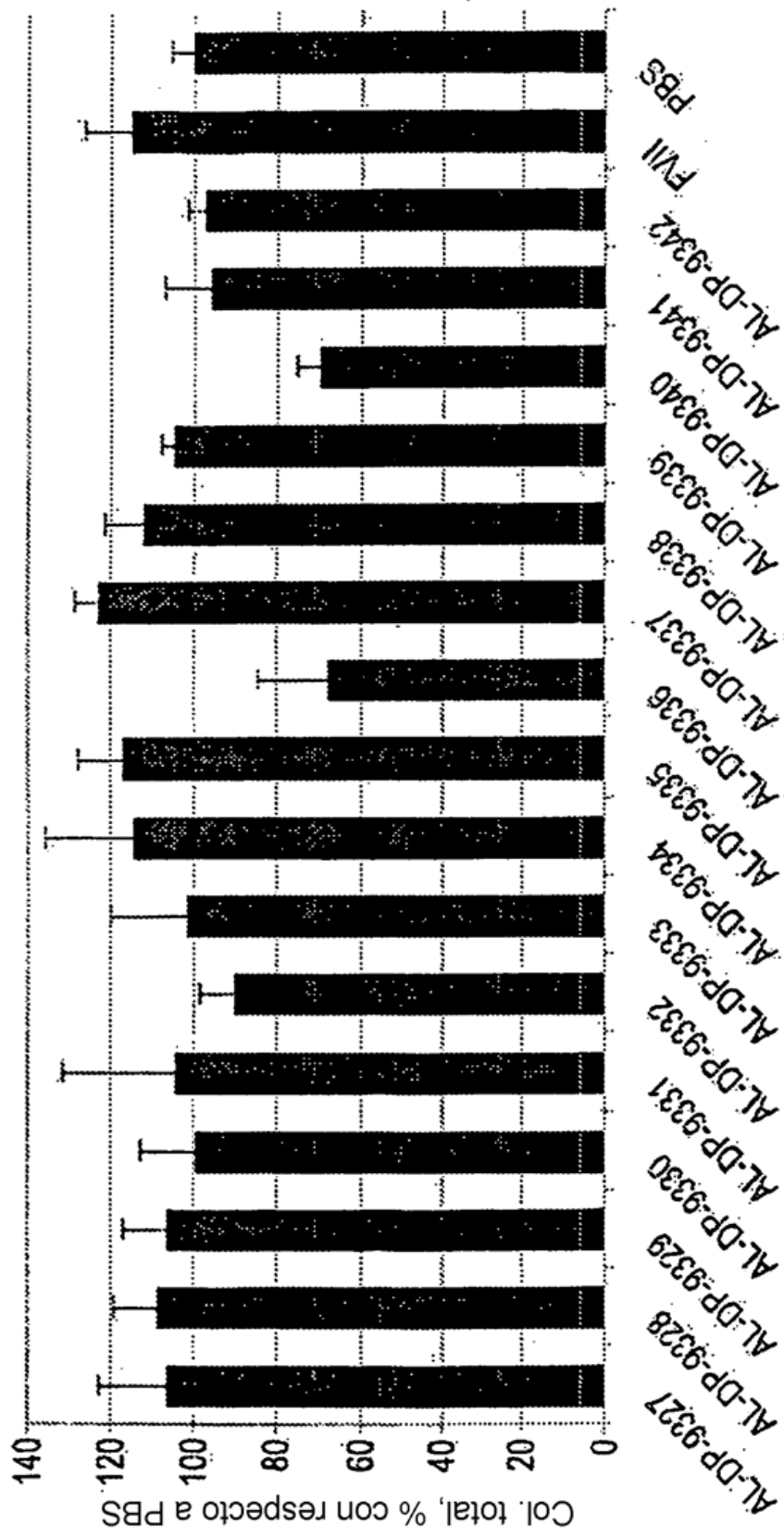


FIG. 4

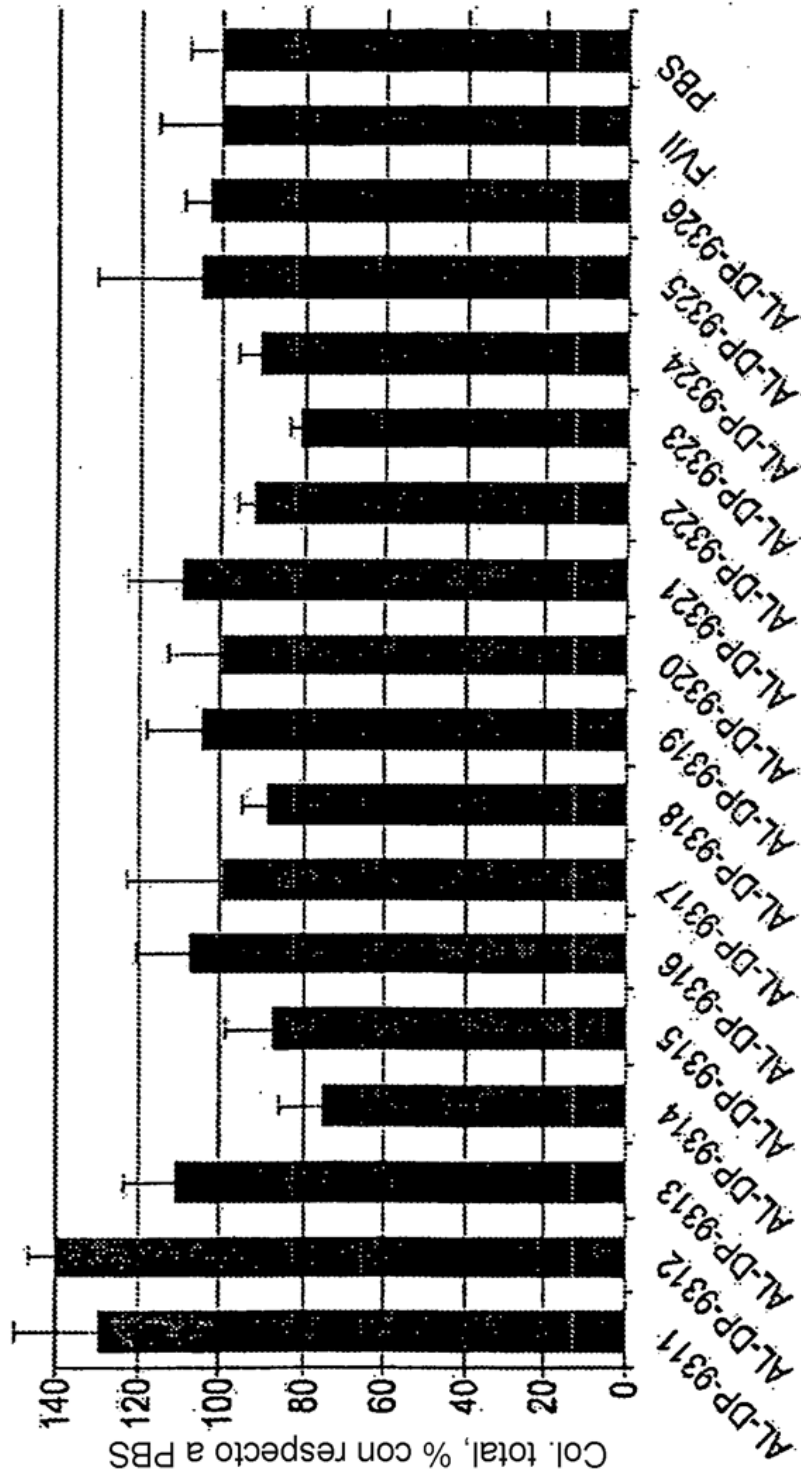
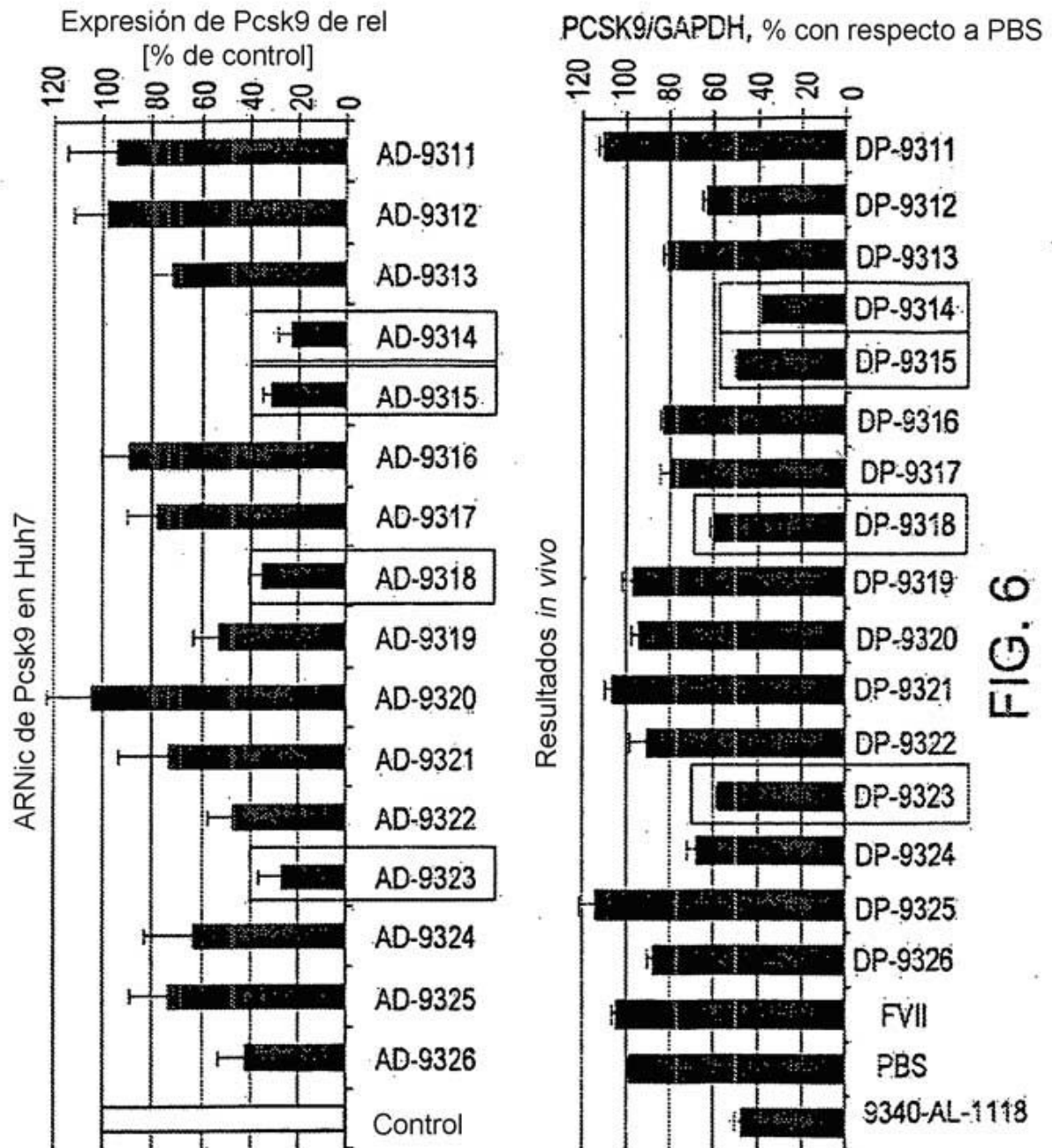


FIG. 5



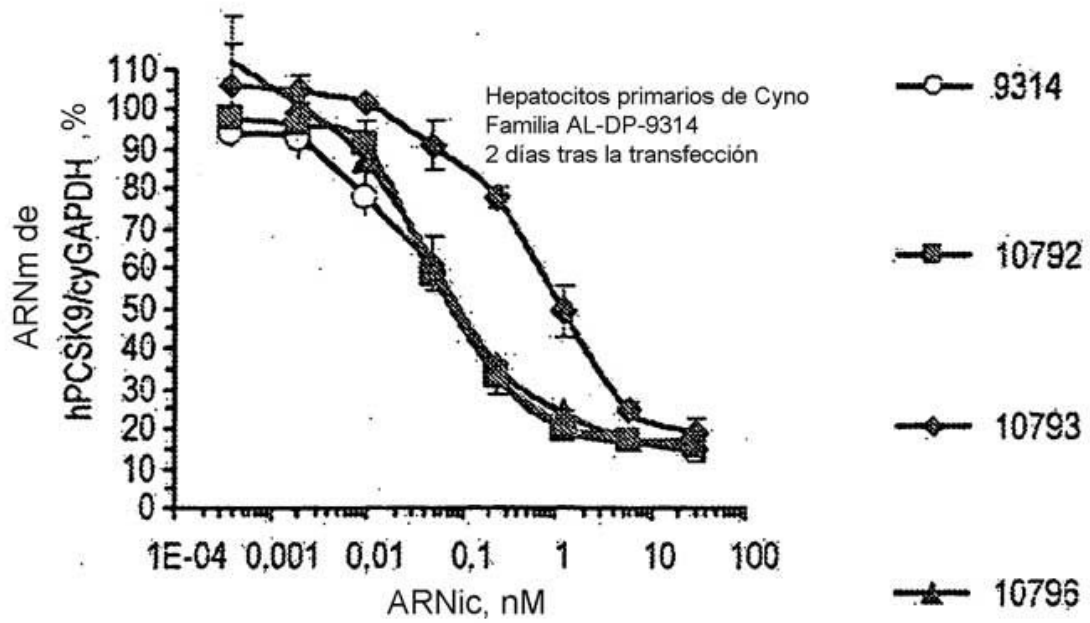


FIG. 7A

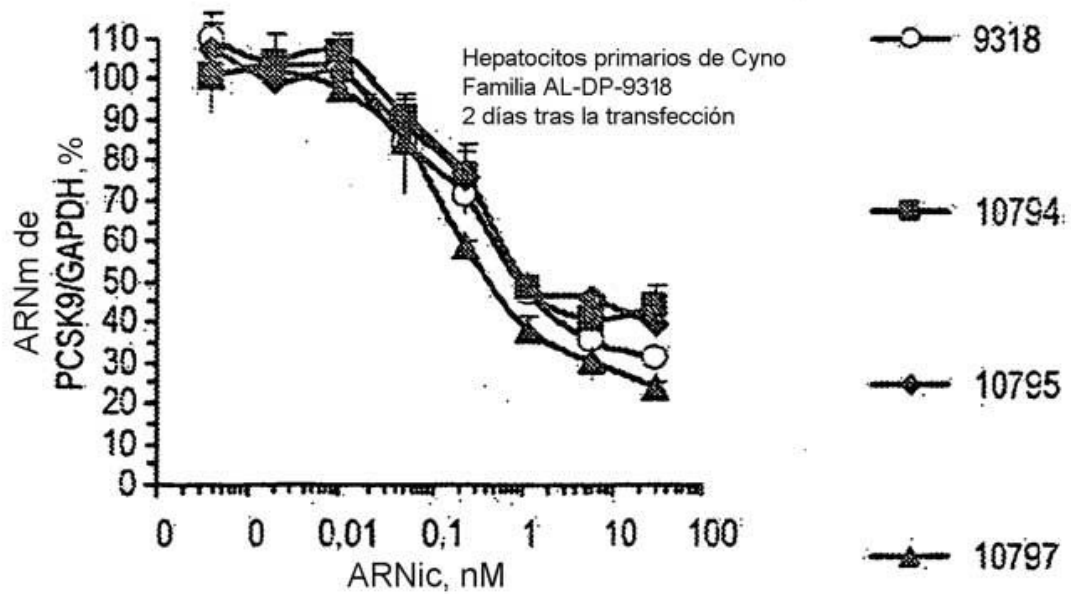


FIG. 7B

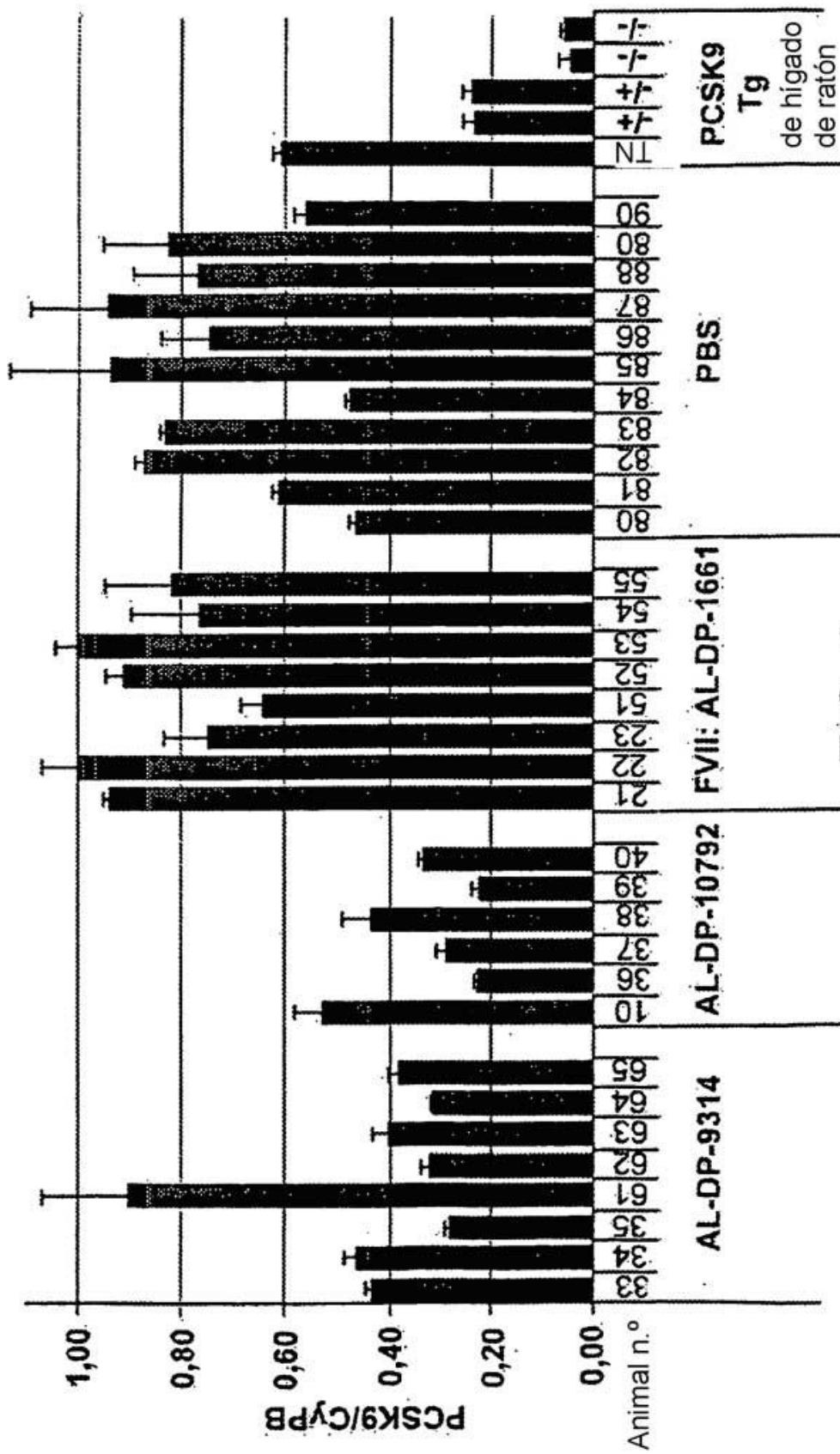


FIG. 8

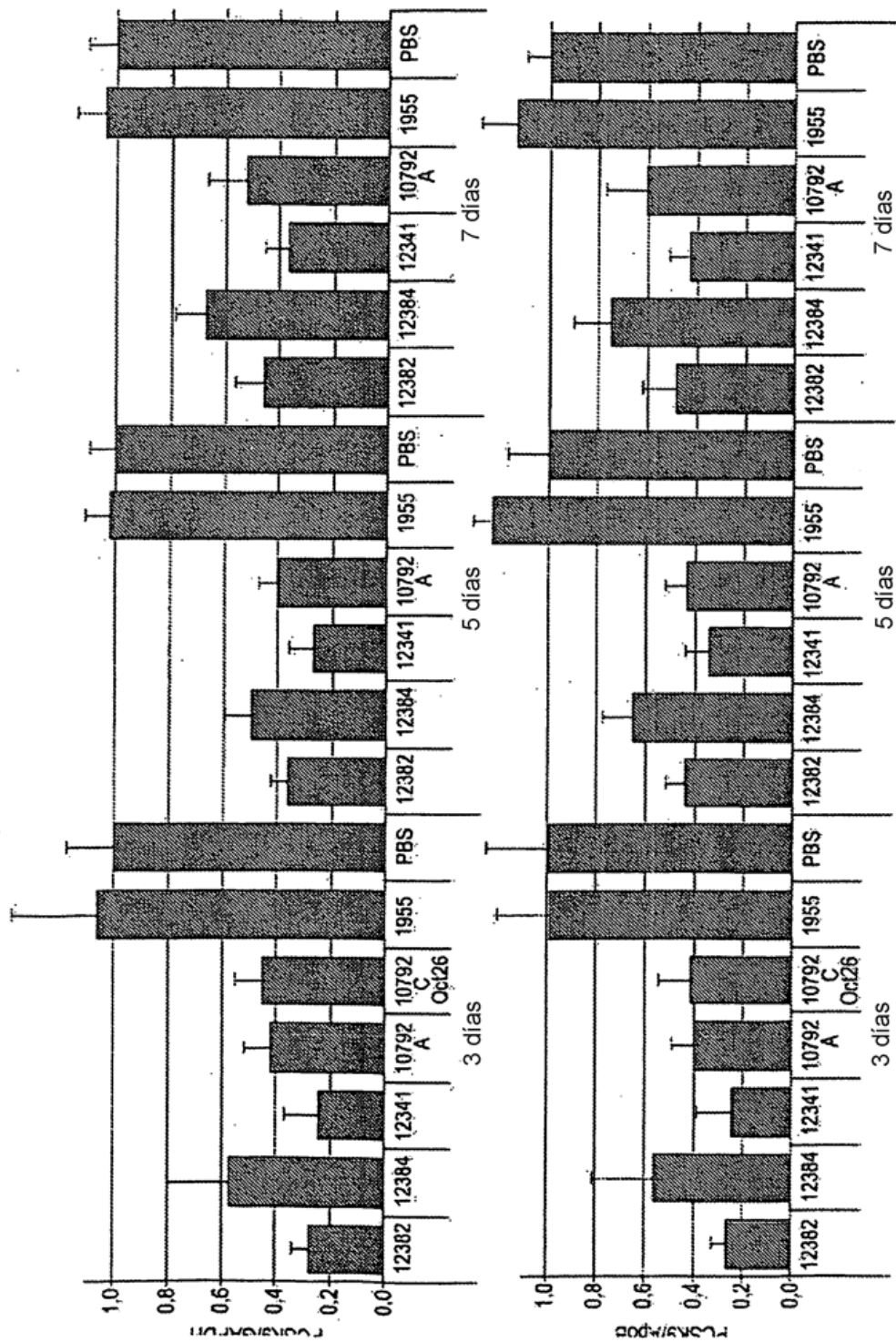


FIG. 9