

(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 PCSK9, 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 esterol (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, Leren, 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).

15

20

25

30

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.

35

40

45

50

55

60

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.

65

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.

5 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.

10 **Sumario de la invención**

La invención está definida por las reivindicaciones.

15 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 biciatenario (ARNbc) para silenciar la expresión de PCSK9.

20 La invención proporciona ácido ribonucleico biciatenario (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 transcripto de ARNm del gen PCSK9.

25 En una realización, la invención proporciona moléculas de ácido ribonucleico biciatenario (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%.

30 35 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.

40 45 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.

50 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.

55 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:

60 (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico biciatenario (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 transcripto de ARNm del gen PCSK9, inhibiendo de ese modo la expresión del gen PCSK9 en la célula.

65 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.

10 **Breve descripción de las figuras**

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

15 La figura 2 muestra los resultados de la selección *in vivo* de 16 ARNic 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 ARNic no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea).

20 La figura 3 muestra los resultados de la selección *in vivo* de 16 ARNic 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 ARNic no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea).

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

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

35 La figura 4 muestra los resultados de la selección *in vivo* de 16 ARNic 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 ARNic no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea).

40 La figura 5 muestra los resultados de la selección *in vivo* de 16 ARNic 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 ARNic no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea).

45 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.

50 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*.

55 **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.

60 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 transcripto 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 específicamente 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 mediarse 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 transcripto 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.

- 5 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
- 10 5 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
- 15 10 proyecciones no deben considerarse apareamientos erróneos con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc 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.
- 20 15 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.
- 25 20 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 ARNbc, o entre la hebra antisentido de un ARNbc y una secuencia diana, tal como se entenderá a partir del contexto de su uso.
- 30 25 Tal como se usa en el presente documento, un polinucleótido que es "sustancialmente complementario a al menos parte de" un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una parte contigua del ARNm de interés (por ejemplo, que codifica para PCSK9). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm de PCSK9 si la secuencia es sustancialmente complementaria a una parte no interrumpida de un ARNm que codifica para PCSK9.
- 35 30 El término "ARN bicatenario" o "ARNbc", 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 ARNbc se denominan a menudo en la bibliografía ARNic ("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 "ARNhc". 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 ARNbc menos cualquier proyección que esté presente en el dúplex. Además de la estructura de dúplex, un ARNbc puede comprender una o más proyecciones de nucleótidos. Además, tal como se usa en esta memoria descriptiva, "ARNbc" 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 ARNic, se abarca mediante "ARNbc" para los fines de esta memoria descriptiva y reivindicaciones.
- 40 45 Tal como se usa en el presente documento, una "proyección de nucleótidos" se refiere al nucleótido o nucleótidos despareados que sobresalen de la estructura de dúplex de un ARNbc cuando un extremo 3' de una hebra del ARNbc se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no hay nucleótidos despareados en el extremo del ARNbc, es decir, no hay proyección de nucleótidos. Un ARNbc con "extremos romos" es un ARNbc 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 ARNbc no se consideran en la determinación de si un ARNbc tiene una proyección o tiene extremos romos.
- 50 55 60 Tal como se usa en el presente documento, la "hebra antisentido" se refiere a la hebra de un ARNbc 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.

- 5 "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
10 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.
- 15 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 transrito 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:
- 20

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

- 25 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,
30 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.

- 35 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
40 obtenida en un ensayo *in vitro* usando diversas moléculas de ARNbc de PCSK9 a diversas concentraciones.

- 45 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 mediarse 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
50 pueden mediarse 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.

- 50 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 mediarse mediante la regulación por disminución del gen PCSK3 o un síntoma manifiesto de procesos patológicos que pueden mediarse 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 mediarse mediante la regulación por disminución del gen PCSK9, la edad e historia del paciente, el estadio de los procesos patológicos que pueden mediarse mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9 y la administración de otros procesos antipatológicos que
55 pueden mediarse mediante la regulación por disminución de la expresión del gen PCSK9.
- 60

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.

5 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.

10 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.

15 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.

40 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.

55 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 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 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.
- 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 inhibidoras 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 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 inhibidora y estabilidad mejoradas, permitiendo así su administración a dosificaciones bajas, es decir, menos de 5 mg/kg de peso corporal del receptor al día.
- 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 "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 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 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-cloroethyl)amina; N-acetil-N'-(p-glioxilbenzoi)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 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.
- 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 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 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).
- 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-alquil-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 oligonucléótidos 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 oligonucléótido conjugado con ligando. Se han descrito previamente conjugados de oligonucléótidos 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 oligonucléótidos 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 oligonucléótidos.
- 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 oligonucléótido confiere propiedades de hibridación potenciadas al oligonucléótido. Además, oligonucléótidos 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 oligonucléótidos 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 oligonucléótido 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 oligonucléótidos 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 automática para proporcionar un oligonucléótido 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, fosforotriésteres, aminoalquilfosforotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilos incluyendo fosfonatos de 3'-alquíleno y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tiofosforamidatos, tioalquilfosfonatos, tioalquilfosforotriésteres, 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, oligonucléótidos) 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 oligonucléótidos 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 tioéster, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (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 polietenglicol (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-oxicolesterol (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 35 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.
- 55 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.
- 60 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

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 el 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 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

45 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 65 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 soluciones acuosas, soluciones no acuosas estériles y no estériles en disolventes comunes tales como alcoholes, o soluciones en bases de aceite líquidas o sólidas. Tales soluciones 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) complejear 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 10 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 15 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, 20 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 polietilenimina para lograr la administración *in vivo* y *ex vivo* (Boletta *et al.*, J. Am Soc, Nephrol. 7: 1 1728 (1996)). Puede 25 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.
- 30 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.

35 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. 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 40 (por ejemplo, almidón, polietilenglicol o acetato de sodio); dispersantes (por ejemplo, almidón o glicolato sódico de almidón); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio).

45 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

55 Los métodos y las composiciones descritas 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 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 65 El método puede comprender administrar una composición que comprende un ARNbc, en el que el ARNbc

comprende un secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una parte de un transcripto 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

15

Paseo génico del gen PCSK9

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

20

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.

25

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

30

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

35

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:

45

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

50

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

55

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.

65

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

Puntuación inespecífica = número de apareamientos erróneos semilla * 10

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

+ número de apareamientos erróneos no semilla * 1

20 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 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 30 Síntesis de ARNic

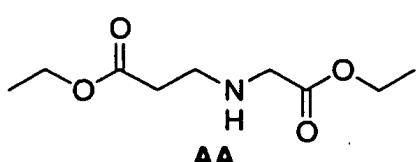
35 35 Se produjeron ARN monocatenarios mediante síntesis en fase sólida en una escala de 1 μ mol usando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemania) y vidrio de poro controlado (CPG, 500 Å, Proligo Biochemic GmbH, Hamburgo, Alemania) como soporte sólido. Se generaron ARN y ARN que contenía nucleótidos de 2'-O-metilo mediante síntesis en fase sólida empleando las correspondientes fosforamiditas y fosforamiditas de 2'-O-metilo, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania).

40 40 Se incorporaron estos elementos estructurales en sitios seleccionados dentro de la secuencia de la cadena oligorribonucleotídica usando química de fosforamidita 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. 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 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.

55 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:

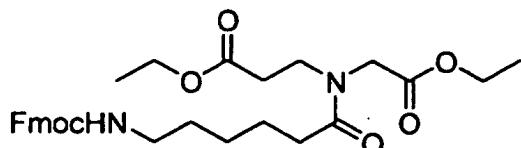
Dietil-2-azabutano-1,4-dicarboxilato AA



60

5 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 anhídrico, se filtró y se evaporó. Se destiló el residuo produciendo AA (28,8 g, 61%).

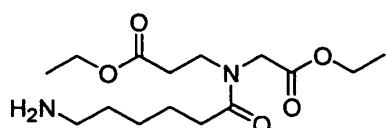
Éster etílico del ácido 3-{etoxicarbonilmethyl-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propiónico AB



AB

10 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.

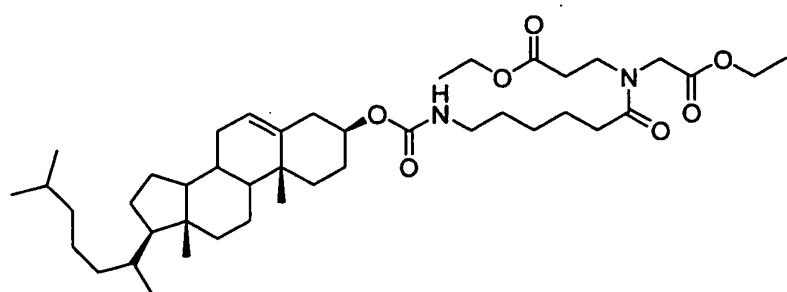
20 Éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmethyl-amino]-propiónico AC



AC

25 Se disolvió éster etílico del ácido 3-{etoxicarbonilmethyl-[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.

30 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}etoxicarbonilmethyl-amino)-propiónico AD

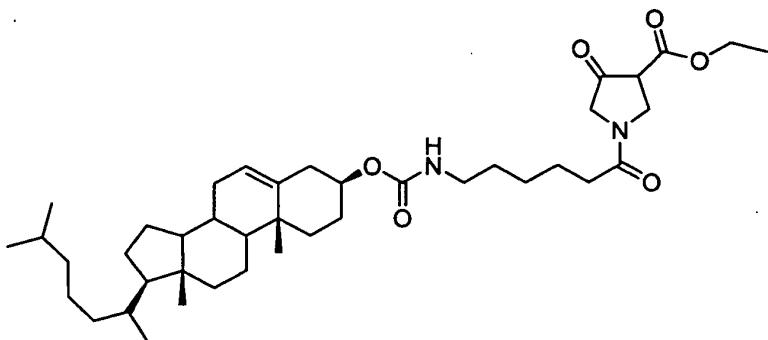


AD

35 Se llevó la sal de clorhidrato del éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmethyl-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 colesterol (6,675 g, 14,8 mmol). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Se diluyó la mezcla de reacción con

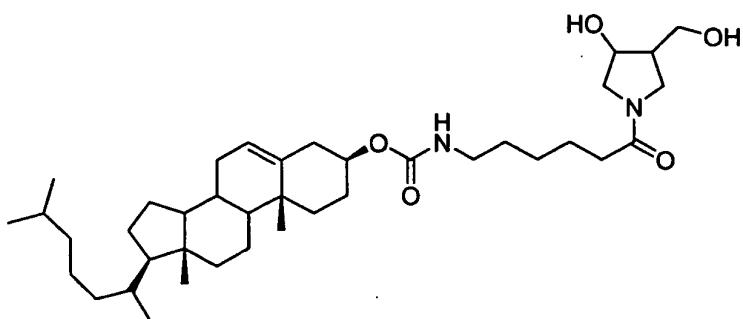
diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico al 10%. Se purificó el producto mediante cromatografía ultrarrápida (10,3 g, 92%).

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]fenanren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil]-4-oxo-pirrolidin-3-carboxílico AE



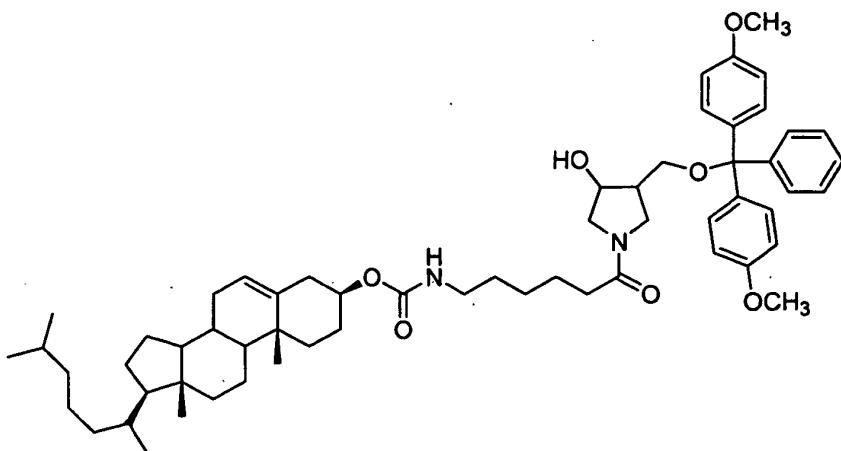
AE

- 10 Se suspendió t-butóxido 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 NaH₂PO₄H₂O 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%).
- 15
- 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]fenanren-3-ílico del ácido [6-(3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]-carbámico AF



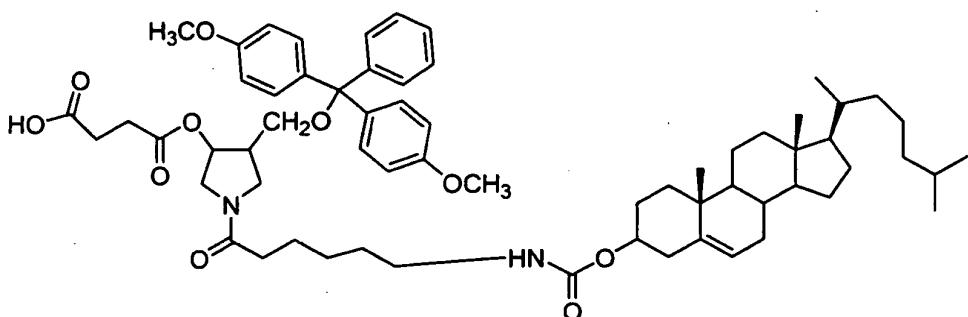
AF

- 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 anhídrico y se concentró a vacío produciendo el producto que se purificó mediante cromatografía en columna (MeOH al 10%/CHCl₃) (89%).
- 30
- 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]fenanren-3-ílico del ácido (6-[3-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidroxi-pirrolidin-1-il]-6-oxo-hexil)-carbámico AG

**AG**

5 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 extinguío 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 anhídrico, 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%).

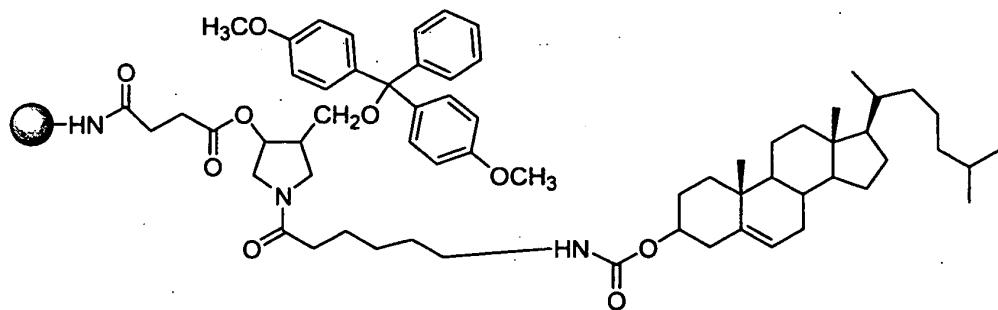
10 Éster mono-(4-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-[6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantrén-3-iloxicarbonilamino]hexanoil]-pirrolidin-3-ílico) del ácido succínico AH

**AH**

15 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 anhídrico (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 anhídrico y se concentró hasta sequedad. Se usó el residuo como tal para la siguiente etapa.

20 CPG derivatizado con colesterol AI

25

**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 colesterol, 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 mutualmente 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)

5 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, estreptomicina 100 μ g/ml (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 HERAcell, 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)

10 complementado para contener un 10% de suero de ternero fetal (FCS) (Biochrom AG, Berlín, Alemania, n.º de cat., S0115), penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 μ g/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 HERAcell, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Alemania).

15 20 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.

25 24 horas tras la transfección, se lisaron las células HuH7 y HspG2 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.

30 35 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 vitroGRO CP (n.º de cat. Z99029) a 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂ en una incubadora humidificada.

40 45 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.

50 55 16 horas tras la transfección, se cambió el medio por medio In vitroGRO CP nuevo con mezcla de antibióticos Torpedo (*In vitro* Technologies, Inc, n.º de cat. Z99000) añadida.

60 65 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.

70 75 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 transcripto de PCSK9 como el porcentaje de transcripto restante a una dosis dada. Secuencias altamente activas son aquéllas con menos del 70% de transcripto restante tras el tratamiento con un ARNic dado a una dosis inferior o igual a 100 nM. Secuencias muy activas son aquéllas que tienen menos del 60% de transcripto restante tras el tratamiento con una dosis inferior o igual a 100 nM. Secuencias activas son aquéllas que tienen menos del 85% de transcripto restante tras el tratamiento con una dosis alta (100 nM). También se seleccionaron ejemplos de ARNic activos *in vivo* en ratón en formulaciones de lipidoídes 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

5 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
 10 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
 15 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

20 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
 25 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 incuba una
 muestra del ARNic formulado con el tinte de unión a ARN Ribogreen (Molecular Probes) en presencia o ausencia de
 30 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

35 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
 40 infrarroja durante aproximadamente 3 min. antes de la dosificación para facilitar la inyección.
 45 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.

50 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 ug/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
 55 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).

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

65 Ejemplos

Se sometieron a prueba 32 ARNic de PCSK9 formulados en liposomas de LNP-01 *in vivo* en un modelo de ratón. Se realizó el experimento a una dosis de ARNic de 5 mg/kg y al menos 10 ARNic de PCSK9 mostraron más del 40% de inactivación de ARNm de PCSK9 en comparación con un grupo control tratado con PBS, mientras que el grupo control tratado con un ARNic no relacionado (factor VII de coagulación sanguínea) no tuvo ningún efecto (figuras 2-5). El silenciamiento del transcripto 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 (véase 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 ARNbc

En otro aspecto de la invención, se expresan moléculas de ARNbc 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 ARNbc pueden transcribirse mediante promotores en dos vectores de expresión separados y transferirse conjuntamente en una célula diana. Alternativamente, cada hebra individual del ARNbc puede transcribirse mediante promotores, ambos de los cuales se ubican en el mismo plásmido de expresión. En una realización preferida, se expresa un ARNbc como una repetición invertida unida por una secuencia de polinucleótido ligadora de manera que el ARNbc tiene una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de ARNbc recombinantes son generalmente plásmidos de ADN o vectores virales. Pueden construirse vectores virales que expresan ARNbc 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 alfavírus 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, Egliitis, *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 ARNbc 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 ARNnp de UI) o generalmente el promotor de ARN polimerasa III (por ejemplo promotor de ARNnp 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-tiogalactopiranósido (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-TKO™). 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 20 invención en células huésped puede monitorizarse usando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, puede 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 NM_174936	Secuencia de hebra sentido (5'-3') ¹	SE Q ID NO:	Secuencia de hebra antisentido (5'-3') ¹	Nombre del dúplex	Porcentaje medio del transcripto de ARNm restante a la concentración de ARNc restante en tipo celular				C150 en hepático de mono cynomologus e [nM]s
					100 nM HepG 2	30 nM HepG 2	30 nM HepG 2	30 nM HepG 2	
2-20	AGCGACGUCCUGAAGGGCUCAATT	1	UGAGGCCUUCACGUCCUUTT	2	AD-15220				35
15-33	CCUCAUUGGUUGCAGGGTT	3	CCGCCUCAACCAUGAGGCTT	4	AD-15275				56
16-34	ACUCAUUGGUUGCAGGGTT	5	CCGCCUUCACCAUGAGGCTT	6	AD-15301				70
30-48	ACGGGGCGCCGGGUUCAAGUUTT	7	ACUGAACGGGGCGGCCGCTT	8	AD-15276				42
31-49	CGGGCGCCGGGUUCAAGUUTT	9	ACUGAACGGGGCGGCCGCTT	10	AD-15302				32
32-50	GGGGCGCCGGGUUCAAGUUTT	11	GAACUGAACGGGGCGGCCCTT	12	AD-15303				37
40-58	CCGUUCAGUUCAGGGUGCTT	13	CAAGACCCUGACUGAACGGTT	14	AD-15221				30
43-61	UUCAGUUCAGGGUGUGAGCTT	15	GCUCAGACCCUGAACUGAAATT	16	AD-15413				61
82-100	GUAGAGACUCCUCUGGGTT	17	CCGCCCGAGCCAGUCUCACTT	18	AD-15304				70
100-118	GGCGGGGACGCGGUUGUGCTT	19	GC AACGACGGGUCCGGCTT	20	AD-15305				36
101-119	GGCGGGACGCGGUUGUGCATT	21	UGCAACGACGGGUCCGGCTT	22	AD-15306				20
102-120	CCGGGACGGGUUGUGCAGCTT	23	CUGCAACGACGGGUCCGGTT	24	AD-15307				38
105-123	GGACGGGUUGGUUGCAGCAGTT	25	CUGCUGCAACGACGGGUCCCTT	26	AD-15277				50
135-153	UCCCCAGCCAGGAUUCGGCTT	27	CGCGGAAUCCUGGCCUGGGAT	28	AD-9526	74			89
135-153	UCCCCAGGAAUUCGGCTT	29	CGCGGAAUCCUGGCCUGGGAT	30	AD-9652				97
136-154	CCCCAGCCAGGAUUCGGCTT	31	GGCGGGAAUCCUGGCCUGGGAT	32	AD-9519				78
136-154	CCCCAGCCAGGAUUCGGCTT	33	GGCGGGAAUCCUGGCCUGGGAT	34	AD-9645				66
138-156	CAGCCAGGAUUCGGCTT	35	GGCGGGAAUCCUGGCCUGGGAT	36	AD-9523				55
138-156	cAGccAGGAuucGcGcT	37	GGCGGGAAUCCUGGCCUGGGAT	38	AD-9649				60
185-203	AGCUCCUGACAGUCCCT	39	GGAGGACUGUGCAGGAGCT	40	AD-9569				112
185-203	AGGucuGcAcAGuucccT	41	GGAGGACUGUGCAGGAGCT	42	AD-9695				102

205-223	CACCGAAAGGCUAAGCCGTT	43	CGCCUUCUAGCCUUGCCGUGTT	44	AD-15222
208-226	CGCAAAGGCUAAGGCCGTT	45	CAGGCCUUCUAGCCUUGCCGTT	46	AD-15278
210-228	CAAAGGCUAAGGCCCTT	47	GGGGGGCCUUCUAGCCUUGTT	48	AD-15178
232-250	GUUGGACCGGGCACGGCUCTT	49	GAGGCCUUCUCCGGGUCCACTT	50	AD-15308
233-251	UGGACCGGGCACGGCUCTT	51	AGAGGCCUUCGGGGGUCCATT	52	AD-15223
234-252	GGACCCGGCACGGCUUATT	53	UAGAGGCCUUCGGGGGUCCTT	54	AD-15309
235-253	GACCGGCACGGCUUAGTT	55	CUAGAGGCCUUCGGGGGUCCTT	56	AD-15279
236-254	ACCGCGCACGGCUUAGTT	57	CCUAGAGGCCUUCGGGGGUCCTT	58	AD-15194
237-255	CCGGCACGGCUUAGGUTT	59	ACCUAGAGGCCUUCGGGGGUCCTT	60	AD-15310
238-256	CGCGCACGGCUUAGGUCTT	61	GACCUAGAGGCCUUCGGGGGUCCTT	62	AD-15311
239-257	GGGCACGGCUUAGGUCTT	63	AGACCUAGAGGCCUUCGGGGGUCCTT	64	AD-15392
240-258	CGCACGGCUUAGGUCTT	65	GAGACCUAGAGGCCUUCGGGGGUCCTT	66	AD-15312
248-266	CUCUAGGUUCUCCUGGAGTT	67	CUGGGCAGGAGACCUAGAGTT	68	AD-15313
249-267	UCUAGGUUCUCCUGGAGGT	69	CCUGGGCAGGAGACCUAGATT	70	AD-15280
250-268	CUAGGUUCUCCUGGAGGATT	71	UCCUGGGGAGGAGACCUAGTT	72	AD-15267
252-270	AGGUUCUCCUGGCAAGACATT	73	UGUCCUGGGAGGAGACCU	74	AD-15314
258-276	CCUCGCGCAAGAACCAACCTT	75	GGUUUGGUUCUUCGGGAGGTT	76	AD-15315
300-318	CGUCAGGUCCAGGGGUCCCT	77	GGACCGGGCUGGAGGUAGCT	78	AD-9624
300-318	cGucAGucuAGGcGGucuTsT	79	GGACCGGGCUGGAGGUAGCT	80	AD-9750
301-319	GUCAGGUCCAGGGGUCCUT	81	AGGACCGGGCUGGAGGUAGCT	82	AD-9623
301-319	GucAGucuAGGcGGucuTsT	83	AGGACCGGGCUGGAGGUAGCT	84	AD-9749

500-518	AUCCGU GG GU GG GU GG GU GG GT	127	CCAGGCAACCUCU CC ACGGAU TT	128	AD-15281	89
509-527	GGUUGCCUGGACCUA CG UTT	129	ACGUAGGU GG CCAGGAACCTT	130	AD-15282	75
542-560	AGGAGACCACCU C UCUG C ATT	131	UGCGAGAGGGGGGU CC UTT	132	AD-15319	61
543-561	GGAGACCCACCUCUC CG AGTT	133	CUGCGAGAGGGGGGU CC UTT	134	AD-15226	56
544-562	GAGACCCACCUCUC CG AGTT	135	ACUGCGAGAGGGGU CC UTT	136	AD-15271	25
549-567	CCACCU CG CAGU CG AGTT	137	CUCUGACUGCGAGAGGGGTT	138	AD-15283	25
552-570	CCUCUC CG CAGU CG AGGGCTT	139	GCGGCUCU CG CAGU CG AGGGTT	140	AD-15284	64
553-571	CUCUCG CG CAGU CG AGGGCATT	141	UGCGGCUCU CG CAGU CG AGGGTT	142	AD-15189	17
554-572	UCUCGGCAGU CG CAGAGGCCACTT	143	GUGGCCUCU CG CAGU CG GAGATT	144	AD-15227	62
555-573	CUCG CG CAGU CG CAGAGGCCACUT T	145	AGUGGCCUCU CG CAGU CG GAGT T	146	AD-15227	0.20
555-573	cucGcAGucAGAGGcGcAcu T	147	AGUGGCCUCU CG CAGU CG GAGT T	148	AD-9673	57
558-576	GCAGUC CA AGGCGCACUG CC T T	149	GCGAGU GG GGCUCU CG CACUG CC T T	150	AD-9548	60
558-576	GcAGucAGAGGcGcAcu T	151	GcAGAGU GG GGCUCU CG CACUG CC T T	152	AD-9674	57
606-624	GGGAU AC CUCACCAAGAU CT T	153	GAUCU GG GGAGGU AC UCCCT T	154	AD-9529	60
606-624	GGGAu AC ucu AC AAAGAu T T	155	GAUCU GG GGAGGU AC UCCCT T	156	AD-9655	140
659-677	UGGU GA AGAUGAGUGGGGAT T	157	UCGCCACUCAUCU U ACCA T T	158	AD-9605	27
659-677	uGGu GA AGA u uGAGu GG GT T	159	UCGCCACU CA uACU U uACCA T T	160	AD-9731	31
663-681	GAAGAUGAGUGGGGACCU U T	161	CAGGU GG CCACUCAUCU U CT	162	AD-9596	37
663-681	GAAGC u uGA Gu Gu GG Gu GG GT T	163	cAGGU GG CCACU u ACU U U T	164	AD-9722	76
704-722	CCCAUGU GG GACUACAU CG AT T	165	UCCGAUGUAGUGGACAU GG GT T	166	AD-9583	42
704-722	cccAu Gu Gu Ac Ac u u CG AT T	167	UCCGAUGUAGUGGACAU GG GT T	168	AD-9709	104

718-736	AUCCAGGGAGGACUCCUCUGT _{ST}	169	CAGAGGAGGUCCUCCUGAU _{ST}	170	AD-9579	113
718-736	AucGAGGAGGA <u>cc</u> ccu _u GT _{ST}	171	cAGAGGAGGUCCUCCUGAU _{ST}	172	AD-9705	81
758-776	GGAA <u>CC</u> U <u>GG</u> AG <u>GG</u> A <u>U</u> U <u>AC</u> TT	173	GUAAUCGGCUCCAGGUCC _T	174	AD-15394	32
759-777	GAACCUGGAGGGAUU <u>AC</u> TT	175	GGUAAUCCGGCUCCAGGUU _{CT}	176	AD-15196	72
760-778	AACCU <u>GG</u> AG <u>GG</u> A <u>U</u> U <u>AC</u> TT	177	GGGUAAUCCGGCUCCAGGUU _T	178	AD-15197	85
777-795	CCCUCACGGGUACCGGCGT _T	179	CGCCCCGUACCGU <u>GG</u> AGGGTT	180	AD-15198	71
782-800	CACGGUACCGGGGUACGG <u>A</u> GT _{ST}	181	UCAUCCGGGGGUACCGU <u>GT_{ST}</u>	182	AD-9609	66
782-800	cACGU <u>Ac</u> cGG <u>GG</u> GG <u>A</u> GT _{ST}	183	U <u>Ac</u> UCCGGGGGUACCGU <u>GT_{ST}</u>	184	AD-9735	115
783-801	ACGGUACCGGGGG <u>GA</u> U <u>GA</u> AT _{ST}	185	UUCAUCCGGGGGUACCGU _{ST}	186	AD-9537	145
783-801	AcGG <u>Gu</u> AccGG <u>GG</u> GG <u>Gu</u> GA <u>AT</u> _{ST}	187	UUCAUCCGGGGGUACCGU _{ST}	188	AD-9663	102
784-802	CGGUACCGGGGG <u>GA</u> U <u>GA</u> AT _{ST}	189	AUUCAUCCGGGGGUACCG _T _{ST}	190	AD-9528	113
784-802	cGG <u>Gu</u> AccGG <u>GG</u> GG <u>Gu</u> GA <u>AT</u> _{ST}	191	AUUCAUCCGGGGGUACCG _T _{ST}	192	AD-9654	107
785-803	GGUACCGGGGG <u>GA</u> U <u>GA</u> AU <u>AT</u> _{ST}	193	UAUUCAUCCGGGGGUACCT _T _{ST}	194	AD-9515	49
785-803	GG <u>Gu</u> AccGG <u>GG</u> GG <u>Gu</u> GA <u>AT</u> _{ST}	195	UAU <u>Gu</u> AccGGGGGUACCT _T _{ST}	196	AD-9641	92
786-804	GUACCGGGGG <u>GA</u> U <u>GA</u> AA <u>AT</u> _{ST}	197	GUAUUCAUCCGGGGGUAC _T _{ST}	198	AD-9514	57
786-804	GuAccGG <u>GG</u> GG <u>Gu</u> GA <u>AT</u> _{ST}	199	GUAU <u>Gu</u> AccGGGGGUAC _T _{ST}	200	AD-9640	89
788-806	ACCGGGGG <u>GA</u> U <u>GA</u> AA <u>AC</u> AT _{ST}	201	UGGUAUCAUCCGGGGGU _{ST}	202	AD-9530	75
788-806	AccGG <u>GG</u> GG <u>Gu</u> GA <u>AA</u> AC <u>AT</u> _{ST}	203	UGGUAU <u>Gu</u> AccGGGGGU _{ST}	204	AD-9656	77
789-807	CCGGGGGG <u>GA</u> U <u>GA</u> AA <u>AC</u> AG _{ST}	205	CUGGUAUCAUCCGGGGGU _{ST}	206	AD-9538	80
789-807	cGG <u>GG</u> GG <u>Gu</u> GA <u>AA</u> AC <u>AG</u> _{ST}	207	CUGGUAU <u>Gu</u> AccGGGGGU _{ST}	208	AD-9664	53
825-843	CCUGGGGG <u>GA</u> U <u>GA</u> U <u>AC</u> U <u>CT</u> _{ST}	209	GAGAUACCUCCACCA <u>GG</u> _{ST}	210	AD-9598	83

825-843	ccuGGuGGGGuGuAucucTsT	211	GAGAUuACCCUCeACcAGGTsT	212	AD-9724	127
826-844	CUGGGGGGGGUuAUCUCCTsT	213	GGAGAUuACCCUCcACCAGTsT	214	AD-9625	88
826-844	cuGGuGGGGGuGuAucucTsT	215	GGAGAUuACCCUCcACCAGTsT	216	AD-9751	60
827-845	UGGGGGGGGGuGuAUCUCUTsT	217	AGGAGAUuACCCUCACCATsT	218	AD-9556	46
827-845	uGGuGGAGGGGuGuAucucTsT	219	AGGAGAUuACCCUCACCATsT	220	AD-9682	38
828-846	GGGGGGGGGUuAUCUCUTsT	221	UAGGAGAUuACCCUCACCCTsT	222	AD-9539	63
828-846	GGGGGGGGGuGuAucucATsT	223	uAGGAGAUuACCCUCACCCTsT	224	AD-9665	83
831-849	GGAGGGGGuGUuCUCCUAGACTsT	225	GUCCUAGGGAGAUuACCCUCCTsT	226	AD-9517	36
831-849	GGAGGGGGuGuAucucuAGACTsT	227	GUCCuAGGGAGAUuACCCUCCTsT	228	AD-9643	40
833-851	AGGUGUuAUCUCUuAGACACTsT	229	GUGUCCUAGGGAGAUuACCCUCUTsT	230	AD-9610	36
833-851	AGGUGuGuAucucuAGACAcTsT	231	GUGUCCuAGGGAGAUuACCCUCUTsT	232	AD-9736	34
833-851	AGGUuGuAfuCfuCfuAfuGfaCfaCTTsT	233	p-guSgUuCfuAfuGfAfAfuAfefuTsT	234	AD-14681	0,04
833-851	AGGUuGuAfuAfuCfuCfuAfuGAGAcFACTsT	235	GUGUCCUuAGGGAGAUuACACTCTUTsT	236	AD-14691	27
833-851	AgGuGuAfuCcuJuaGacCaCTsT	237	p-guSgUuCfuAfuGfAfAfuAfefuTsT	238	AD-14701	32
833-851	AgGuGuAfuCfuCfuAfuGacCaCTsT	239	GUGUCCUuAGGGAGAUuACACTCTUTsT	240	AD-14711	33
833-851	AgGuGuAfuCfuAfuGacCaCTsT	241	GUGUCCuAGGGAGAUuACAcuTsT	242	AD-14721	22
833-851	AGGUuGuAfuCfuCfuAfuGAGAcFACTsT	243	GUGUCCuAGGGAGAUuACAcuTsT	244	AD-14731	21
833-851	AgGuGuAfuCcuJuaGacCaCTsT	245	GUGUCCuAGGGAGAUuACAcuTsT	246	AD-14741	22
833-851	GfAfAfCfuUfuAfAfGfCfuGfGfAfTsT	247	p-UCfuAgGfCfuAfuGfAfGfGfuGfTsT	248	AD-15087	37
833-851	GfAfAfCfuUfuAfAfGfGfCfuGfGfAfTsT	249	UfCfCfAGGGCfCfuAfuGAGGGfUTCTsT	250	AD-15097	51
833-851	GcAcCcUcAuAgGcCuGgATsT	251	p-UCfuAgGfCfuAfuGfAfGfGfGfGfTsT	252	AD-15107	26

833-851	GeAcCcUAAuAaGcCcGgATsT	253	UUCGCGCtCtUaUaUAGGGUUCGCTsT	254	AD-	15117	28
833-851	GGAGCtCcUaUaAaGcCcUaGgATsT	255	UCCAGCtCUauGAGGGuGtTsT	256	AD-	15127	33
833-851	GGAGCtCcUaUaAaGcCcUaGgATsT	257	UCCAGCtCUauGAGGGuGtTsT	258	AD-	15137	54
833-851	GeAcCcUAAuAaGcCcGgATsT	259	UCCAGCtCUauGAGGGuGtTsT	260	AD-	15147	52
836-854	UGUAUCUCCUAGACACCAAGTsT	261	CUGGUGGUtCAGGAGAUACATsT	262	AD-	9516	94
836-854	UGUAUCUCCUAGACACCAAGTsT	263	CUGGUGGUtCAGGAGAUACATsT	264	AD-	9642	105
840-858	UCUCCUAGACACCAAGAUATsT	265	UAUGCUUUGGUtCAGGAGATsT	266	AD-	9562	46
840-858	ucuccuAGACACCAAGAUATsT	267	uAUGCUUUGGUtCAGGAGATsT	268	AD-	26	34
840-858	UUCUUCtCUaUaAaGtCcAaUATsT	269	p-UAUtGtCtUgGtGUtCUAUtGtAATsT	270	AD-	14677	38
840-858	UUCUUCtCUaUaGACtACtCAGtFAUATsT	271	UUAUtGtCtUgGtGUtGUtUAGGAGATsT	272	AD-	14687	52
840-858	UcUcCuAGAcCcGtAUATsT	273	p-UAUtGtCtUgGtGUtCUAUtGtAATsT	274	AD-	14697	35
840-858	UcUcCuAGAcCcGtAUATsT	275	UUAUtGtCtUgGtGUtGUtUAGGAGATsT	276	AD-	14707	58
840-858	UcUcCuAGAcCcGtAUATsT	277	UAUUGCGtGUgtGUtUAGGAGATsT	278	AD-	14717	42
840-858	UUCUUCtCUaUaGtCcAaUATsT	279	UAUUGCGtGUgtGUtUAGGAGATsT	280	AD-	14727	50
840-858	UcUcCuAGAcCcGtAUATsT	281	UAUUGCGtGUgtGUtUAGGAGATsT	282	AD-	14737	32
840-858	AAGtGtCtUaUaAaCtAaCtGtAUATsT	283	p-cCtGtAUtAAUtAAACtUtCtAAGtGtAUATsT	284	AD-	15083	16
840-858	AGGCtCtUaUaGAGtAUtAUtUAGtAUATsT	285	CtCtGtAAUtAAUtAAACtUtCtAAGGtCtUtAUATsT	286	AD-	15093	24
840-858	AGGtGtGtGtGtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUATsT	287	p-cCtGtAUtAAUtAAACtUtCtAAGGtCtUtAUATsT	288	AD-	15103	11
840-858	AGGtGtGtGtGtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUATsT	289	CtCtGtAAUtAAUtAAACtUtCtAAGGtCtUtAUATsT	290	AD-	15113	34
840-858	AAGtGtCtUaUaGAGtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUATsT	291	CCGAuuaAAACtCCAGGtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUATsT	292	AD-	15123	19
840-858	AGGCtCtUaUaGAGtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUATsT	293	CCGAuuaAAACtCCAGGtAUtAUtAUtAUtAUtAUtAUATsT	294	AD-	15133	15

840-858	AgGcCAGeAgUuUuUuCgGTsT	295	CCGAuAuaAACuCCAGGccuTsT	296	AD-15143	16
841-859	CCUCLAGACACCAGCAUACTsT	297	GUAUCCGGGUUCUAGGAGTsT	298	AD-9521	50
841-859	cucuuAGAcAccAGeAuAcTsT	299	GuAUCCGGGUUCUAGGAGTsT	300	AD-9647	62
842-860	UCCUAGACACCAGCAUACATsT	301	UGUAUGCCGGGUUCUAGGAGTsT	302	AD-9611	48
842-860	uccuAGAcAccAGeAuAcATsT	303	UGUAUGCCGGGUUCUAGGAGTsT	304	AD-9737	68
843-861	CCUAGACACCAGCAUACAGTsT	305	CGUUAUGCCGGGUUCUAGGAGTsT	306	AD-9592	55
843-861	ccuAGAcAccAGeAuAcAGTsT	307	CGUUAUGCCGGGUUCUAGGAGTsT	308	AD-9718	78
847-865	GACACCAGCAUACAGAGUcTsT	309	CACUCUGUAUGCCGGGUcTsT	310	AD-9561	64
847-865	GACAcAGeAuAuAGGuGTsT	311	cACUCUGUAUGCCGGGUcTsT	312	AD-9687	84
855-873	CAUACAGAGUgACCACCGTsT	313	CCGGGGGUACACUUGUAUGTsT	314	AD-9636	42
855-873	cAUAcAGAGUgAccAccGGTsT	315	CCGGGGGUeACUCUGUAUcTsT	316	AD-9762	41
860-878	AGAGUGACCAACCCGGAAAUcTsT	317	AUUIUCCGGGUUGGUACUCUTsT	318	AD-9540	2,10
860-878	AGAGUGACCAcGGAAAUcTsT	319	AUUIUCCGGGUUGGUACUCUTsT	320	AD-9666	0,40
861-879	GAGUGACCCACCGGGAAAUcTsT	321	GAUUIUCCGGGUUGGUACUCUTsT	322	AD-9535	81
861-879	GAGUGACAccGGGAAAUcTsT	323	GAUUIUCCGGGUUGGUACUCUTsT	324	AD-9661	73
863-881	GUGACCCACCGGGAAAUcUGATsT	325	UCCAUUIUCCGGGUUGGUACUTsT	326	AD-9539	83
863-881	GuGAcAccGGGAAAUcUGATsT	327	UCCAUUIUCCGGGUUGGUACUTsT	328	AD-9685	35
865-883	GACCAACCGGGAAAUCGAGGTsT	329	CCUCGAUUIUCCGGGUUGGUUTsT	330	AD-9533	77
865-883	GAccAccGGGAAAUAcGAGGTsT	331	CCUCGAUUIUCCGGGUUGGUUTsT	332	AD-9659	100
866-884	ACCAACGGGGAAAUAUcGAGGTsT	333	CCUCGAUUIUCCGGGUUGGUUTsT	334	AD-9612	88
866-884	AccAccGGGGAAAUAcGAGGTsT	335	CCUCGAUUIUCCGGGUUGGUUTsT	336	AD-9738	83

867-885	CCACCGGGAAUCGAGGGCTsT	337	GCCCCUCAUUUCCGGGGCTsT	338	AD-9557	75	96
867-885	ccAccGGAAAUaGAGGGcTsT	339	GCCCCUCAUUUCCGGGGCTsT	340	AD-9683	48	
875-893	AAUCGAGGGAGGGUCAUTsT	341	AUGACCCUCCCCUCAAUUTsT	342	AD-9531	31	32
875-893	AAAUcGAGGGAGGGuAUtTsT	343	AUGACCCUCCCCUCAAUUTsT	344	AD-9657	23	29
875-893	AiAUuCfAgGfAgGfCfAgGfCfAUUTsT	345	p-AdUfAgCfUfCfUfCfAgAUuUTsT	346	AD-14673		81
875-893	AAAUUICAGGGCTAGGGGUICfAUUTsT	347	AUGACCTCfUfGCTfCfUfGCTfCAUuUTsT	348	AD-14683		56
875-893	AaAUcAgGgCfGgGuCAUTsT	349	p-AdUfAgCfUfCfUfCfAgAUuUTsT	350	AD-14693		56
875-893	AaAUcAgGgCfGgGuCAUTsT	351	AUGACCTCfUfGCTfCfUfGCTfCAUuUTsT	352	AD-14703		68
875-893	AiAUuCfAgGfAgGfCfAgGfCfAUUTsT	353	AUGACCUfGccCUCGAuutTsT	354	AD-14713		55
875-893	AAAUUICAGGGCTAGGGGUICfAUUTsT	355	AUGACCUfGccCUCGAuutTsT	356	AD-14723		24
875-893	AaAUcAgGgCfUfCfAUfGfCfAUUTsT	357	AUGACCUfGccCUCGAuutTsT	358	AD-14733		34
875-893	CfGfGfAfAfCfUfCfAUfGfCfAUUTsT	359	p-AdUfGfCfUfAUfGfCfGfGfAUfGfCfGfTsT	360	AD-15019		85
875-893	CGGGfACfCfCfUfCfAUfAGGCfCfUfGfTsT	361	CTAGGGfCfUfAUfAGGGfUfGfCfCfGfTsT	362	AD-15089		54
875-893	CgGAcCcUeAUuAGGcGUGTsT	363	p-AdUfGfCfUfAUfGfCfGfGfAUfGfCfGfTsT	364	AD-15099		70
875-893	CgGAcCcUeAUuAGGcGUGTsT	365	CTAGGGfCfUfAUfAGGGfUfGfCfCfGfTsT	366	AD-15109		67
875-893	CfGfGfAfAfCfUfCfAUfGfCfAUUTsT	367	CAGGGCeuAUgAGGGuUccGfTsT	368	AD-15119		67
875-893	CGGGfACfCfCfUfCfAUfAGGCfCfUfGfTsT	369	CAGGGCeuAUgAGGGuUccGfTsT	370	AD-15129		57
875-893	CgGAcCcUeAUuAGGcGUGTsT	371	CAGGGCeuAUgAGGGuUccGfTsT	372	AD-15139		69
877-895	AUCGAGGGAGGGGUCAUGGTsT	373	CCAUGACCCUfGCCCCUCAUTsT	374	AD-9542		160
877-895	AucGAGGGAGGGGUuGGTfTsT	375	CcAUGACCCUfGCCCCUCAUTsT	376	AD-9668		92
878-896	cGAGGGcAGGGGUuGGTfTsT	377	GACcAUGACCCUfGCCCCUCAUTsT	378	AD-9739		109

880-898	GAGGGCAGGGCAUGGUCA ^T	379	UGACCAUGACCCU ^G CCCCU ^C T	380	AD-	56	83
880-898	GAGGGcAGGGicAuGGicAT ^T	381	UGACcAUGACCCU ^G CCCCU ^C T	382	AD-	79	
882-900	GGGCAGGGCAUGGUACCT ^T	383	GGUGACCAUGACCCU ^G CCCCT ^T	384	AD-	82	
882-900	GGGcAGGGicAuGGicAc ^T	385	GGUGACcAUGACCCU ^G CCCCT ^T	386	AD-	63	
885-903	CAGGUCAUGGUACCGACT ^T	387	GUCCGGUGACCAUGACCCUGT ^T	388	AD-	55	
885-903	cAGGGicAuGGicAc ^T	389	GUCCGGUGACcAUGACCCUGT ^T	390	AD-	115	
886-904	AGGUCAUGGUACCCGACUT ^T	391	AGUCCGU ^G ACCAUGACCCUT ^T	392	AD-	111	
886-904	AGGGicAuGGicAc ^T	393	AGUCCGU ^G ACCAUGACCCUT ^T	394	AD-	118	
892-910	AUGGUACACGACUUCGAGAT ^T	395	UCUCGAAGU ^G CGGU ^G ACCAUT ^T	396	AD-	36	1,60
892-910	AuGGicAc ^G AcuGGAGAT ^T	397	UCUCGAAGU ^G CGGU ^G ACCAUT ^T	398	AD-	32	2,50
899-917	CCGACUU ^G GAGAAUGUGCCTT	399	GGCACAUUCUCUGAAGUGGGTT	400	AD-	26	
921-939	GGAGGACGGGACCCGUU ^C TT	401	GAAGGGGU ^G CCGU ^C GUCCU ^C TT	402	AD-	53	
933-1011	CAGGGCCGGGAUGCCGGCT ^T	403	GCCCCAUCCCCGGC ^G CGCU ^G T ^T	404	AD-	126	
933-1011	cAGGcG ^G GGAuG ^c GGcT ^T	405	GCCCCAUCCCCGGCGCGUGT ^T	406	AD-	94	
1020-1038	GGGU ^G CCAGCAUGCCAGCTT	407	GCUU ^G CCCAUGGU ^G GGCACCCCTT	408	AD-	45	
1038-1056	CCU ^G CCGGGU ^G CUAACUGCT ^T	409	GCAGGU ^G AGGACCCGAGGT ^T	410	AD-	112	
1038-1056	ccuGcG ^c GuG ^c GuAc ^A Ac ^G T ^T	411	GcAGUUGAGGACCGGAAGCT ^T	412	AD-	86	
1040-1058	U ^G GGCCGU ^G GU ^C ACUGCCAT ^T	413	UGGCA ^G GU ^G AGGACCCGAT ^T	414	AD-	35	
1040-1058	uGcG ^c GuG ^c GuAc ^A Ac ^G T ^T	415	UGGAGUUGAGGACCCGAT ^T	416	AD-	81	
1042-1060	C ^G CGU ^G GU ^C ACU ^G CCAA ^G T ^T	417	CUU ^G GU ^G AGGACCCGAT ^T	418	AD-	51	
1042-1060	cGcG ^c GuG ^c GuAc ^A Ac ^G T ^T	419	CUU ^G GU ^G AGGACCCGAT ^T	420	AD-	97	

1053-1071	CUGCCAAAGGAAGGGCACGTsT	421	CGUGCCUUCUUUGGAGTsT	422	AD-	74
1053-1071	cuGccAAAGGGAAGGGcAcGTsT	423	CGUGCCUUCUUUGGAGTsT	424	AD-	
1057-1075	CAAGGGAAAGGGCACGGUATT	425	UAACCGUGGCCUUCGUUGTT	426	AD-	9700
1058-1076	AAGGGAAAGGGCACGGUAGTT	427	CUAACCGUGGCCUUCGUUGTT	428	AD-	26
1059-1077	AGGGAAAGGGCACGGUAGCTT	429	GCUAACCGUGGCCUUCGUUGTT	430	AD-	15320
1060-1078	GGGAAGGGCACGGUAGCGTT	431	CGCUAACCGUGGCCUUCGUUGTT	432	AD-	34
1061-1079	GGAAAGGGCACGGUUAAGGGTT	433	CCGCUAACCGUGGCCUUCGUUGTT	434	AD-	15199
1062-1080	GAAGGGCACGGUUAAGGGCTT	435	GCCGCUAACCGUGGCCUUCGUUGTT	436	AD-	64
1063-1081	AAGGGCACGGUUAAGGGCATT	437	UGCCGCUAACCGUGGCCUUCGUUGTT	438	AD-	86
1064-1082	AGGGCACGGUUAAGGGCACTT	439	GUGCCGCUAACCGUGGCCUUCGUUGTT	440	AD-	15167
1068-1086	CACGGUUAAGGGCACCCUUCTT	441	GAGGGUGCCGCUAACCGUGGUUTT	442	AD-	64
1069-1087	ACGGUUAAGGGCACCCUCATT	443	UGAGGGUGCCGCUAACCGUGGUUTT	444	AD-	15322
1072-1090	GUUAGCGGCACCCUCAUAGTT	445	CUAUGAGGGUGCCGCUAACCTT	446	AD-	46
1073-1091	UUAGGGCACCCUCUAGGGTT	447	CCUAUGAGGGUGCCGCUAACATT	448	AD-	15200
1076-1094	GCGGCACCCUCAUAGGCCUUT	449	AGGCCUUAUGAGGGUGCCGCTsT	450	AD-	46
1079-1097	GCACCCUCAUAGGCCUGATsT	451	UCCAGGCCUUAUGAGGGUGCTsT	452	AD-	15213
1085-1103	UCAUAGGGCUGGAGUUUAUTsT	453	AUAAAUCUCCAGGUUAUGATsT	454	AD-	27
1090-1108	GGCCUGGGAGUUUAUUCGGATsT	455	UCCGAUAUAACUCCAGGCCTsT	456	AD-	44
1091-1109	GCCUGGGAGUUUAUUCGGAAATsT	457	UUCCGAAUAUAACUCCAGGCCTsT	458	AD-	35
1091-1109	GccuGGAGGUuAuuGGAAATsT	459	UUCCGAAUAUAACUCCAGGCCTsT	460	AD-	51
1091-1109	GccuGGAGGUuAuuGGAAATsT	461	UUCCGAAUAUAACUCCAGGCCTsT	462	AD-	10792
						0,10
						0,1
						0,1

1093-1111	CUGGAGUUUAUUCGGAAAAATsT	463	UUUUCGAAUAAAACUCCAGTsT	464	AD-9638	101
1093-1111	cuGGAGuuAuuucGGAAAATsT	465	UUUUCGAAuAAAACUCCAGTsT	466	AD-9764	112
1095-1113	GGAGUUUAUUCGGAAAAGCTsT	467	GCUUUUCGAAUAAAACUCCTsT	468	AD-9525	53
1095-1113	GGAGUUUAuucGGAAAAGCTsT	469	GCUUUUCGAAuAAAACUCCTsT	470	AD-9651	58
1096-1114	GAGUUUAUUCGGAAAAGCTsT	471	GGCUUUCGAAuAAAACUCCTsT	472	AD-9560	97
1096-1114	GAOUuuAuuGGAAAAGCTsT	473	GGCUUUCGAAuAAAACUCCTsT	474	AD-9686	111
1100-1118	UUAUUCGGAAAAGCCAGCTsT	475	AGCUUCGUUUCGGAAUATsT	476	AD-9536	157
1100-1118	uuAuuGGAAAAGcAGCTsT	477	AGCUUCGUUUCGGAAUATsT	478	AD-9662	81
1154-1172	CCUGGGGGGGGUACAGTsT	479	CUGUACCCACCCGCCAGGGTsT	480	AD-9584	52
1154-1172	ccuuGGGGuAGGGuACAGTsT	481	CUGuACCCACCCGCCAGGGTsT	482	AD-9710	68
1155-1173	CCUGGGGGGGGUACAGCTT	483	CCUGUACCCACCCGCCAGGT	484	AD-15323	111
1157-1175	UGGGGGGGGUACACCGTsT	485	CCGUUGUACCCACCCGCCATsT	486	AD-9551	91
1157-1175	uGGGGGGGGGuACAGGTsT	487	CCGUUGUACCCACCCGCCATsT	488	AD-9677	62
1158-1176	GGGGGGGGGUACACCGGCTT	489	GGGGGUACCCACCCGCCCTT	490	AD-15230	52
1162-1180	GGGGGGuACAGGGGUACUCCT	491	GGACACGGGUACCCACCTT	492	AD-15231	25
1164-1182	UGGUACAGGGGUACUCCTT	493	GAGGACGGGGGUACCCATT	494	AD-15285	36
1172-1190	GGGGGUUCUCAACGCCGCTT	495	GGGGGUUGAGGGAGGGCTT	496	AD-15396	27
1173-1191	CCGGGUCCUCAACGCCGCTT	497	GGGGGUUGAGGGAGGGCTT	498	AD-15397	56
1216-1234	GUCCGGGUUGGUACCCGUGTsT	499	CAGCUGUGACCAAGCAGACTsT	500	AD-9600	112
1216-1234	GuGuGuGuGuGuGuGuGuTsT	501	cAGCGGUUGACCAAGCAGACTsT	502	AD-9726	95
1217-1235	UCCGUUCGUACCGUGCTsT	503	GCAGCGGUUGACCAAGCAGATsT	504	AD-9606	107

1217-1235	ucGucGcuGGGucAacGcuGcTst	505	GcAGCGGUGUGACcaGcACGATst	506	AD-9732	105
1223-1241	UGGUCACCAcUCCGGCAATst	507	UUGCCGGCAGGGUGACCATst	508	AD-9633	75
1223-1241	uGGucAccGcuGccGGcAAATst	509	UUGCCGGcAGGGUGACCATst	510	AD-9759	111
1224-1242	GGUCACCGCUGCCGGCAACTst	511	GUUGCCGGCAGGGUGACCTst	512	AD-9588	66
1224-1242	GGucAccGcuGccGGcAAcTst	513	GUUGCCGGcAGGGUGACCTst	514	AD-9714	106
1227-1245	CACCGCUGCGGGCAACUUCUCTst	515	GAAGUUGCCGGCAGGGUGTst	516	AD-9589	85
1227-1245	cAccGcuGccGGcAAcUucTst	517	GAAGUUGCCGGcAGGGUGTst	518	AD-9715	113
1229-1247	CCGGCUGCGGGCAACUUCGGTst	519	CGGAAAGUUGCCGGCAGGGTst	520	AD-9575	120
1229-1247	ccGucGccGGcAAcUucCTst	521	CGGAAGUUGCCGGcAGGGTst	522	AD-9701	100
1230-1248	CCGUGCCGGCAACUUCGGTst	523	CCGGAAAGUUGCCGGCAGGGTst	524	AD-9563	103
1230-1248	cGucAccGGcAAcUucGGTst	525	CCGGAAAGUUGCCGGcAGGGTst	526	AD-9689	81
1231-1249	GCUGCCGGCAACUUCGGTst	527	CCGGAAAGUUGCCGGCAGGGTst	528	AD-9594	95
1231-1249	GuuGucGGcAAcUucGGTst	529	CCGGAAAGUUGCCGGcAGGGTst	530	AD-9720	92
1236-1254	CGGCAACUUCGGGACGAUTst	531	AUCGUCCGGAAAGUUGCCGTst	532	AD-9585	83
1236-1254	cGGcAAcUucGGGAcGAuTsT	533	AUCGUCCGGAAAGUUGCCGTst	534	AD-9711	122
1237-1255	GGCAACUUCGGGACGAUGTst	535	CAUCGUCCGGAAAGUUGCCGTst	536	AD-9614	100
1237-1255	GGcAAcUucGGGAcGAuGTst	537	CAUCGUCCGGAAAGUUGCCGTst	538	AD-9740	198
1243-1261	UUCGGGACGAUGCCUGCCCTst	539	GCCAGGGCAUCGUCCGGAAATst	540	AD-9615	116
1243-1261	uucGGGAcGAuGcuGccTst	541	GccAGGGcAUcGUCCGGAAATst	542	AD-9741	130
1248-1266	GGACGAUCCUGCCUCUACTst	543	GUAGAGGGAGGCAUCGUCCCTst	544	AD-9534	32
1248-1266	GGACGAUCCUGCCUCUACTst	545	GUAGAGGGAGGCAUCGUCCCTst	546	AD-9534	32

1248-1266	GGAcGAuGccuGccuAcT ^t	547	GuAGAGGcAGGcAUCGUCC ^t	548	AD-9660	89	79
1279-1297	GUCCCCGAGGGUCAUCAGTT	549	CUGUGAUCACCUCCGGAGCTT	550	AD-15324	46	
1280-1298	CUCCCCGAGGUCAUCAGUTT	551	ACUGUGAUGACCUCGGAGTT	552	AD-15232	19	
1281-1299	UCCCGAGGUCAUCAGUUTT	553	AACUGUGAUGACCUCCGGATT	554	AD-15233	25	
1314-1332	CCAAGACCAGCCGGUGACCTT	555	GGUCACCGGUGGUUCUGGTT	556	AD-15234	59	
1315-1333	CAAGACCAGCCGGUGACCTT	557	GGUGUACCCGGCUUCUGGTT	558	AD-15286	109	
1348-1366	ACCAACUUUGCCCGUUGUGT ^t	559	CACAGGGCCAAAGUUGGUT ^t	560	AD-9590	122	
1349-1366	AccAAcuuGccGccGuGCT ^t	561	cAcAGGGCCAAAGUUGGUT ^t	562	AD-9716	114	
1350-1368	CAACUUUGCCCGUUGUGT ^t	563	CACACAGGGCCAAAGUUGGUT ^t	564	AD-9632	34	
1350-1368	cAAcuuGccGccGuGcGCT ^t	565	cAcAcAGGGCCAAAGUUGGUT ^t	566	AD-9738	96	
1360-1378	CGCUGUGGGACCUCUUUGT ^t	567	CAAAGAGGUCCACACGGGT ^t	568	AD-9567	41	
1360-1378	cGcuGuGcGAccuGccuuGT ^t	569	CAAAGAGGUCCAcAcGGGT ^t	570	AD-9693	50	
1390-1408	GACAUCAUUGGUGGCCUCCAT ^t	571	UGGAGGGCACCACAUUGUGCT ^t	572	AD-9586	81	104
1390-1408	GACAcAuuGGuGccuAcAT ^t	573	UGGAGGGcACcAAUGAUGUGCT ^t	574	AD-9712	107	
1394-1412	UCAUUGGGCUCCAGGGAT ^t	575	UGGGUGGAGGcACAAUGAT ^t	576	AD-9564	120	
1394-1412	uCAuuGGuGccuAcAGGGAT ^t	577	UCCGUGGAGGcACAAUGAT ^t	578	AD-9690	92	
1417-1435	AGCACCUUGCUUUGUGUCACT ^t	579	GUAGACACAAAGCAGGGUGCT ^t	580	AD-9616	74	84
1417-1435	AGCACCUUGCUUUGUGUCACT ^t	581	GUGAcAcAAAGcAGGUGUGCT ^t	582	AD-9742	127	
1433-1451	CAACAGUGGGGACAUACATT	583	UGUGAUGUCCCAUCUGUGTT	584	AD-15398	24	
1486-1504	AUGCUGUCUGCCAGCCGGT ^t	585	CCGGCUCGGCAGACACAU ^t	586	AD-9617	111	
1486-1504	AuGuGccuGccGAGccGGT ^t	587	CCGGCUCGGcAGAcAGAU ^t	588	AD-9743	104	

1491-1509	GUCUGCCGAGCCGGAGCUCTsT	589	GAGCUCCGGCUCGGAGACTsT	590	AD-9635	73	90
1491-1509	GuuGccGAGccGGAGucTsT	591	GAGCUCCGGCUCGGAGACTsT	592	AD-9761	83	
1521-1539	GUUGAGGCAGAGACUGAUCTsT	593	GAUCAGUCUCUGCCUCAACTsT	594	AD-9568	76	
1521-1539	GuuGAGGcAGAGAGAGucTsT	595	GAucaGUCUCUGCCUCAACTsT	596	AD-9694	52	
1527-1545	GCAGAGACUGAUCCACUUCTsT	597	GAAGUGGAUCAGUCUCUGCTsT	598	AD-9576	47	
1527-1545	GcAGAGAGAGAGAGAGucTsT	599	GAAGUGGAUCAGUCUCUGCTsT	600	AD-9702	79	
1529-1547	AGAGACUGAUCCACUUCUUCTsT	601	GAGAAGUGGAUCAGUCUCUUTsT	602	AD-9627	69	
1529-1547	AGAGAGAGAGAGAGAGAGucTsT	603	GAGAAGUGGAUCAGUCUCUUTsT	604	AD-9753	127	
1543-1561	UUCUCUGCCAAAAGAUGUCATsT	605	UGACAUUUUGGAGAGAATsT	606	AD-9628	141	
1543-1561	uuuucuGccAAAGAGAGucATsT	607	UGAcAUUUUGGAGAGAATsT	608	AD-9754	89	
1545-1563	CUCUGCCAAAAGAUGUCAUTsT	609	GAUGACAUUUUGGAGAGTsT	610	AD-9631	80	
1545-1563	euuucuGccAAAGAGAGucAucTsT	611	GAUGACAUUUUGGAGAGTsT	612	AD-9757	78	
1580-1598	CUGAGGACAGCGGGGUACUTsT	613	AGUACCCGGCUGGUCCUCAGTsT	614	AD-9595	31	32
1580-1598	euGAGGACcAGcGGGuAucTsT	615	AGuACCCGGCUGGUCCUCAGTsT	616	AD-9721	87	70
1581-1599	UGAGGACCAAGCGGGGUACUGTsT	617	CAGUACCCGGCUGGUCCUCATsT	618	AD-9544	68	
1581-1599	uGAGGAcAAAGGGGuAucGtTsT	619	cAGuACCCGGCUGGUCCUCATsT	620	AD-9670	67	
1666-1684	ACUGUAUGGUAGCCACACUTT	621	AGUGUGUGACCAUACAGUTT	622	AD-15235	25	
1668-1686	UGUAUGGUAGGACACUCGTt	623	CGAGUGUGUGACCAUACATT	624	AD-15236	73	
1669-1687	GUAUUGGUAGCACACUCGGTT	625	CCGAGUGUGUGACCAUACTT	626	AD-15168	100	
1691-1715	GGAUUGGCCACAGCCGUCGGCTT	627	GCGACGGCUGGUCCCAUCCTT	628	AD-15174	92	
1698-1716	GAUGGCCACAGCCGUCGCCTT	629	GGCAGACGGCUGGUCCCAUCTT	630	AD-15325	81	

1806-1824	CAAGCUGGUCUGCCGGCCCTT	631	GGCCCCGGAGACCAAGCUUUGTT	632	AD-15326	65
1815-1833	CUGCCGGGCCAACACGCUUSt	633	AGCGUUGUGGGGGCCGGAGTSt	634	AD-9570	42
1815-1833	uGcGGGccAcAAGcUuTSt	635	AGCGUUGUGGGGGCCGGAGTSt	636	AD-9696	77
1816-1834	UGCCGGGGCCACACCUUUTSt	637	AGCGUUGUGGGGGCCGGAGTSt	638	AD-9566	38
1816-1834	uGcGGGccAcAAGcUuTSt	639	AGCGUUGUGGGGGCCGGAGTSt	640	AD-9692	78
1818-1836	CGGGGCCACAAACGGCUUUUUTSt	641	AAAAAGGGUUGUUGGGGGGGGSt	642	AD-9532	100
1818-1836	ccGGGccAcAAGcUuUuUuTSt	643	AAAAGGGUUGUUGGGGGGGGSt	644	AD-9658	102
1820-1838	GGGGCCACAAACGCCUUUUGGSt	645	CCAAAAAGGGUUGUUGGGGGCCCTSt	646	AD-9549	50
1820-1838	GGGccAcAAGcUuuuGGTSt	647	CcAAAAAGGGUUGUUGGGGCCCTSt	648	AD-9675	78
1840-1858	GGUGAGGGGUGUCUACGCCATSt	649	UGGGGUAGACACCCUCACCTSt	650	AD-9541	43
1840-1858	GGuAGGGGuAGcUuAcGcSt	651	UGGGGUAGACACCCUCACCTSt	652	AD-9667	73
1843-1861	GAGGGGUUCUACGCCAUUUGTSt	653	CAAUGGGGUAGACACCCUCUSt	654	AD-9550	36
1843-1861	GAGGGGuGuuAGcUuAUuGSt	655	CAAUGGGGuAGACACCCUCUSt	656	AD-9676	100
1861-1879	GCCAGGGGUUCUCCUJACCTSt	657	GUAGCAGGGAGCACCUUGGCTSt	658	AD-9571	27
1861-1879	GccAGGGGuGuuGuuGuuAcSt	659	GuAGCAGGGAGCACCUUGGCTSt	660	AD-9697	32
1862-1880	CCAGGGGUUCUCCUJACCTSt	661	GGUAGCAGGGAGCACCUUGGCTSt	662	AD-9572	74
1862-1880	ccAGGuGuuGuuGuuAcSt	663	GGuAGCAGGGAGCACCUUGGCTSt	664	AD-9698	89
2008-2026	ACCCACAAGGCCUUGGCTT	665	GCACAGGGAGCACCUUUGGGGTT	666	AD-15327	82
2023-2041	GUUCUGAGGCCACGGGUCTSt	667	GACCUUCAGGGAGGGAGACTSt	668	AD-9639	30
2023-2041	GuGuAGGGGuAGGGGSt	669	GACCUUCAGGGAGGGAGACTSt	670	AD-9765	35
2024-2042	UGCUGAGGCCACGGGUCASt	671	UGACCUUCAGGGAGGGAGCTSt	672	AD-9518	74
						0,60

2024-2042	UGCUGAGGCCACGAGGUCA ^T	673	UGACCUUCUGGGCCUCAGCAT ^T	674	AD-9518	31		
2024-2042	uGcuAGGccAcAGGGuCA ^T	675	UGACCUUCUGGGCCUCAGCAT ^T	676	AD-9644	35	37	2,60
2024-2042	UfgCfuGfaGfGfCfAfGfGfGuAfT ^T	677	p-uGfaCfUfGfGfGfCfUfGfGfAf ^T	678	AD-14672	26		
2024-2042	UfGCTUfGAGGCUfCfAcGfAGGUfCfA ^T	679	UfGACfCfUfGfGfGfCfUfGfGfAf ^T	680	AD-14682	27		
2024-2042	UgCuGgCcAcGgCcA ^T	681	p-uGfaCfUfGfGfGfCfUfGfGfAf ^T	682	AD-14692	22		
2024-2042	UgCuGgCcAcGgCcA ^T	683	UfGACfCfUfGfGfGfCfUfGfGfAf ^T	684	AD-14702	19		
2024-2042	UfgCfuGfaGfGfCfAfGfGfGuAfT ^T	685	UgACCUUCUGGGCCUCAGCAT ^T	686	AD-14712	25		
2024-2042	UfGCTUfGAGGCUfCfAcGfAGGUfCfA ^T	687	UGACCUUCUGGGCCUCAGCAT ^T	688	AD-14722	18		
2024-2042	UgCuGgCcAcGgCcA ^T	689	UGACCUUCUGGGCCUCAGCAT ^T	690	AD-14732	32		
2024-2042	GfuOfgUfAfAfGfGfCfGfGfGuGfT ^T	691	p-cAfUfCfCfGfGfCfGfGfAf ^T	692	AD-15078	86		
2024-2042	GUfGGUfCfAGGfCfGGfCfGGGAuGfCT ^T	693	CTAUfCfCfCfGGfCfGGfCfUfCfACfCf ^T	694	AD-15088	97		
2024-2042	GuGfUcAgCgGcGfGfGuGfT ^T	695	p-cAfUfCfCfGfGfCfGfGfAf ^T	696	AD-15098	74		
2024-2042	QuGfUcAgCgGcGfGfGuGfT ^T	697	CTAUfCfCfCfGGfCfUfCfACfCf ^T	698	AD-15108	67		
2024-2042	GfuOfgUfAfAfGfGfCfGfGfGuGfT ^T	699	CAUCCGgGCgCUGACcaC ^T	700	AD-15118	76		
2024-2042	GUfGGUfCfAGGfCfGGGAuGfT ^T	701	CAUCCGgGCgCUGACcaC ^T	702	AD-15128	86		
2024-2042	GuGfUcAgCgGcGfGfGuGfT ^T	703	CAUCCGgGCgCUGACcaC ^T	704	AD-15138	74		
2030-2048	GGCCACGAGGUcAGCCAA ^T	705	UUGGGCUGACCUUCUGGGCTT	706	AD-15237	30		
2035-2053	CGAGGUcAGCCAAACCA ^T	707	ACUGGGUfGGGCUfGACCUUC ^T	708	AD-15287	30		
2039-2057	GUCAGCCAAACCA ^T	709	ACGGCACUfGGGUfGGCUAC ^T	710	AD-15238	36		
2041-2059	CAGCCCAACCA ^T	711	CCACCGCACUfGGGUfGGCU ^T	712	AD-15328	35		
2062-2080	CACAGGGAGGCCAGCAUCC ^T	713	GGAUfGGUfGGCUfGGCU ^T	714	AD-15399	47		

2072-2090	CCAGCAUCCACGGUUCCUGT sT	715	CAGGAAGCGUGGAUGCGUGG sT	716	AD-9582	37
2072-2090	ccAGcAuccAcGcuuccuG sT	717	cAGGAAGCGUGGAUGCGUGG sT	718	AD-9708	81
2118-2136	AGUCAAAGGAGCAUGGAU ^C T sT	719	GAUUCCAUGCUCCUUGACUT sT	720	AD-9545	31
2118-2136	AGucAAGGAGcAuGGAAu ^C T sT	721	GAUUCCAUGCUCCUUGACUT sT	722	AD-9671	15
2118-2136	AfgUcAfaG ^f gA ^f gCfaUfgCfaAu ^f Cf ^f T sT	723	p-gAfUfUfCfaUfgCfaCfCfUliGfaCfU ^f T sT	724	AD-14674	33
2118-2136	AGUICIAAGGAGCfAUfGAAu ^C T sT	725	GAUuUICIAUfGCUUfCfUliGACfUfTs sT	726	AD-14684	2,50
2118-2136	AGUCAAGGAGGAGCfAUfGAAu ^C T sT	727	p-gAfUfUfCfaUfgCfaCfCfUliGfaCfU ^f T sT	728	AD-14694	16
2118-2136	AGUCAAGGAGGAGCfAUfGAAu ^C T sT	729	GAUuUICIAUfGCUUfCfUliGACfUfTs sT	730	AD-14704	26
2118-2136	AfgUcAfaG ^f gA ^f gCfaUfgCfaAu ^f Cf ^f T sT	731	GAUUCcaUfGcuCCUfGacu ^f T sT	732	AD-14714	18
2118-2136	AGUICfAUAGGAGCfAUfGAAu ^C T sT	733	GAUUCcaUfGcuCCUfGacu ^f T sT	734	AD-14724	27
2118-2136	AGUCAAGGAGGAGCfAUfGAAu ^C T sT	735	GAUUCcaUfGcuCCUfGacu ^f T sT	736	AD-14734	20
2118-2136	GfcdfGfCfCfCfUfGfCfUf ^f T sT	737	p-gAfUfCfaUfgCfUfGfCfGf ^f T sT	738	AD-15080	18
2118-2136	GCGGCTACCTCfUfCfUfAGGCTfUf ^f T sT	739	AGGCfCfUfAUfGAGGfUfGfCfCfCf ^f T sT	740	AD-15090	18
2118-2136	GcGgCcCcCuCuGfCcUf ^f T sT	741	p-gAfUfCfaUfgCfUfGfCfGf ^f T sT	742	AD-15100	29
2118-2136	GcGgCcCcCuCuGfCcUf ^f T sT	743	AGGCfCfUfAUfGAGGfUfGfCfCfCf ^f T sT	744	AD-15110	23
2118-2136	GfcGfGfCfCfCfUfGfCfUf ^f T sT	745	AGGCCuauUfagGGfUfGfCfCfCf ^f T sT	746	AD-15120	20
2118-2136	GCGGCTACCTCfUfCfUfAGGCTfUf ^f T sT	747	AGGCCuauUfagGGfUfGfCgCf ^f T sT	748	AD-15130	20
2118-2136	GcGgCcCcCuCuGfCcUf ^f T sT	749	AGGCCuauUfagGGfUfGfCgCgC ^f T sT	750	AD-15140	19
2122-2140	AAGGAGGAGAUAUCCCGG sT	751	CCGGGAUUCCAUGCUCCUUT sT	752	AD-9522	59
2122-2140	AAGGAGGAGcAuGGAAuuccGG sT	753	CCGGGAUUCCAUGCUCCUUT sT	754	AD-9648	78
2123-2141	AGGAGGAGAUAUCCCGG sT	755	CCGGGAUUCCAUGCUCCUUT sT	756	AD-9552	80

2123-2141	AGGAGcAU GG AAu cc GG c T	757	GCCGGGAUUC c AUGCUCCUTsT	758	AD-9678	76
2125-2143	GAGCA GG AAUCCGGCC T	759	GGCCGGAUCCAU GG CUCTsT	760	AD-9618	90
2125-2143	GAGcAU GG AAu cc GG c T	761	GGCCGGAUUC c AUGCUCTsT	762	AD-9744	91
2230-2248	GCCUACGCCGUAGACAACATT	763	UGUUUGCUACGCCGUAGGCTT	764	AD-15239	38
2231-2249	CCUACGCCGUAGACAACACTT	765	GUGUUGCUACGCCGUAGGTT	766	AD-15212	19
2232-2250	CUACGCCGUAGACAACACGTT	767	CGUGUGUCUACGCCGUAGTT	768	AD-15240	43
2233-2251	UACGCCGUAGACAACACGUTT	769	ACGUGUGUCUACGCCGUATT	770	AD-15177	59
2235-2253	CGCCGUAGACAACACGUGTT	771	ACACGUGUUGUCUACGCCGT	772	AD-15179	13
2236-2254	GCCGUAGACAACACGUGUGTT	773	CACACGUGUUGUCUACGGCTT	774	AD-15180	15
2237-2255	CCGUAGACAACACGUGUGTT	775	ACACACGUGUUGUCUACGGTT	776	AD-15241	14
2238-2256	CGUAGACAACACGUGUGUATT	777	UACACACGUGUUGUCUACGTT	778	AD-15268	42
2240-2258	UAGACAAACACGUGUGUGUATT	779	ACUACACACGGUGUUGUCUATT	780	AD-15242	21
2241-2259	AGACAAACACGUGUGUGUACGTT	781	GACUACACACGGUGUGUGUATT	782	AD-15216	28
2242-2260	GACAAACACGUGUGUGUGUACATT	783	UGACUACACACGGUGUGUGUATT	784	AD-15176	35
2243-2261	ACAAACACGUGUGUGUGUACGTT	785	CUGACUACACACGGUGUGUATT	786	AD-15181	35
2244-2262	CAACACGUGUGUGUAGUCAGGTT	787	CCUGACUACACACGGUGUGUATT	788	AD-15243	22
2247-2265	CACGUGUGUGUGUAGGAGCTT	789	GCUCCUGACUACACGGUGTT	790	AD-15182	42
2248-2266	ACGUGUGUAGUCAGGAGCCTT	791	GGCUCCUGACUACACGGUGTT	792	AD-15244	31
2249-2267	CGUGUGUAGUCAGGAGGCGTT	793	CGGCUCUCUGACUACACGGTT	794	AD-15387	23
2251-2269	UGUGUAGUCAGGAGGGGGTT	795	CCGGGUCCUGACUACACATT	796	AD-15245	18
2257-2275	GUCAGGAGCCGGGACGU C ATsT	797	UGACGUCCCCGGCUCUGACTsT	798	AD-9555	34

2257-2275	GucAGGAGGccGGGAcGucATsT	799	UGACGUCCCCGGCCUCUGACTsT	800	AD-9681	55
2258-2276	UCAGGAGCCGGGACGUAGTstT	801	CUGACGUCCCCGGCCUCUGATsT	802	AD-9619	42
2258-2276	ucAGGAGCcGGGAcGucAGTstT	803	CUGACGUCCCCGGCCUCUGATsT	804	AD-9745	56
2259-2277	CAGGAGCCGGGACGUAGTstT	805	GCUGACGUCCCCGGCCUCUGTstT	806	AD-9620	44
2259-2277	cAGGAGCcGGGAcGucAGTstT	807	GCUGACGUCCCCGGCCUCUGTstT	808	AD-9746	89
2263-2281	AGCCGGGACGGUAGCACUATT	809	UAGUGUGUAGGUUCGGGUUUTT	810	AD-15288	19
2265-2283	CCGGGACGUAGCACUACATT	811	UGUAGUGGUAGGUCCCCGGTT	812	AD-15246	16
2303-2321	CCGUGACAGCCGUUGCCAUtt	813	AUGGCAACGGGUAGUACCGTT	814	AD-15289	37
2317-2335	GCCAUUCUGGUGCCGGAGCCTsT	815	GGCUCCGGCAAGCACAUUGGCTsT	816	AD-9324	59
2375-2393	CCCAUCCAGGAUGGGUGUTT	817	ACACCCAUCUCCUAGGAAUGGGTT	818	AD-15329	103
2377-2395	CAUCCAGGAUGGGUGUCUTT	819	AGACACCCCAUCUCCUGGGGAUTT	820	AD-15330	62
2420-2438	AGCUUUAAAUGGUUCCGATT	821	UCGGAAACCAUUUUAAAAGCUTT	822	AD-15169	22
2421-2439	GCUUUUAAAUGGUUCCGACTT	823	GUCCGGAAACCAUUUUAAAAGCTT	824	AD-15201	6
2422-2440	CUUUUAAAUGGUUCCGACUTT	825	AGUCGGAAACCAUUUUAAAAGTT	826	AD-15331	14
2423-2441	UUUUAAAUGGUUCCGACUUTT	827	AAGUCGGAAACCAUUUUAAAATT	828	AD-15190	47
2424-2442	UUUUAAAUGGUUCCGACUUUTT	829	CAAGUCGGAAACCAUUUUAAAATT	830	AD-15247	61
2425-2443	UUUUAAAUGGUUCCGACUUUTT	831	ACAAGUCGGAAACCAUUUUATT	832	AD-15248	22
2426-2444	AAAAUUGGUUCCGACUUGUCTT	833	GACAAGUCGGAAACCAUUUUUTT	834	AD-15175	45
2427-2445	AAAUGGUUCCGACUUGUCCTT	835	GGACAAGUCGGAAACCAUUUUUTT	836	AD-15249	51
2428-2446	AAUGGUUCCGACUUGUCCTT	837	GGGACAAGUCGGAAACCAUUUTT	838	AD-15250	96
2431-2449	GGUUCCGACUUGUCUUTT	839	AGAGGGACAAGUCGGAAACCTT	840	AD-15400	12

2457-2475	CUCCAUGGCCUGGCACGAGTT	841	CUUGGUGCCAGGCCAUUGGAGTT	842	AD-15332		22
2459-2477	CCAUGGCCUGGCACGGGTT	843	CCCUCGUGCCAGGCCAUUGGTT	844	AD-15388		30
2545-2563	GAACUCACUCACUCUGGUTT	845	ACCCAGAGUGAGUGAGUUCCTT	846	AD-15333		20
2549-2567	UCACUCACUCUGGGUGCCUTT	847	AGGCACCCAGAGUGAGUGATT	848	AD-15334		96
2616-2634	UUUCACCAUCAAAAGGUTT	849	ACCUGUUUAGAUGGUAGAAATT	850	AD-15335		75
2622-2640	CAUUCAAACAGGUGCAGGUCUTT	851	AGCUCGACCUUUCUUAUGTT	852	AD-15183		16
2623-2641	AUUCAAAACAGGUCGAGCUGTT	853	CAGCUCCACCUUUCUUAUUTT	854	AD-15202		41
2624-2642	UUCAAAACAGGUGCAGCUGGUTT	855	ACAGCUCGACCUUUCUUAATT	856	AD-15203		39
2625-2643	UCAAAACAGGUCGAGCUGUGTT	857	CACAGCUCGACCUUUCUUGATT	858	AD-15272		49
2626-2644	CAAAACAGGUCGAGCUGUGCTT	859	GCACAGCUCGACCUUUCUUGTT	860	AD-15217		16
2627-2645	AAACAGGUCGAGCUGUGCUTT	861	AGCACAGCUCGACCUUUCUUTT	862	AD-15290		15
2628-2646	AAACAGGUCGAGCUGUGCUTT	863	GAGCACAGCUCGACCUUUCUUTT	864	AD-15218		13
2630-2648	CAGGUCGAGCUGUGCUCGGTT	865	CCGAGCACAGCUCGACCUUGTT	866	AD-15389		13
2631-2649	AGGUCGAGCUGUGCUCGGGTT	867	CCCGAGCACAGCUCGACCUUTT	868	AD-15336		40
2633-2651	GUCGAGCUGUGCUCGGGUTT	869	CACCCGAGCACAGCUCGACTT	870	AD-15337		19
2634-2652	UCGAGCUGUGCUCGGGUGCTT	871	GCACCCGAGCACAGCUCGATT	872	AD-15191		33
2657-2675	AGCUCGUCCCCAAUUGUGGGTT	873	CGGCACACAUUUGGGAGCAGCTT	874	AD-15390		25
2658-2676	GCUGGUCCCCAAUUGUGCCGATT	875	UCGGCACAUUUGGGAGCAGCTT	876	AD-15338		9
2660-2678	UGCUCCCCAAUUGUGCCGAUGTT	877	CAUCGGCACAUUUGGGAGCATT	878	AD-15204		33
2663-2681	UCCCCAAUUGUGCCGAUGUCCTT	879	GGACACAUUUGGGACAUUUGGATT	880	AD-15251		76
2665-2683	CCAAUUGGCCGAUGUCGUTT	881	ACGGACACAUUUGGCACAUUUGGTT	882	AD-15205		14

2666-2684	CAAUUGGCCGAUGUCCAUUUTT	883	CACGGACAUCCGGCACAUUUTT	884	AD-15171
2667-2685	AAUGUGCCGAUGUCCGUUGGTT	885	CCACGGACAUCCGGCACAUUUTT	886	AD-15232
2673-2691	CCGAUAGGCCAUCCGGCAGAATT	887	UUCUGGCCACGGACAUCCGGTT	888	AD-15339
2675-2693	GAUGUCCGGGGGAGAAUUGTT	889	CAUUCUGGCCACGGACAUUUTT	890	AD-15253
2678-2696	GUCCGGGGGAGAAUAGACUUTT	891	AGUCAUUUCUGGCCACGGACTT	892	AD-15340
2679-2697	UCCGUUGGGAGAAUAGACUUTT	893	AAGUCAUUUCUGGCCACGGATT	894	AD-15291
2683-2701	UGGCCAGAAUAGACUUUUAUTT	895	AUAAAAGUCAUUUCUGCCCAUTT	896	AD-15341
2694-2712	ACUUUUAUUGAGCUUUGGTT	897	ACAUAGGCUCAUAAAAGGTT	898	AD-15401
2700-2718	AUUGAGCUCUUUGUCCGUUTT	899	CACGGAAACAAAGAGCUUAAUTT	900	AD-15342
2704-2722	AGCUUUUGUCCGUCCAGTT	901	CUGGCACGGAAACAAAGGTT	902	AD-15343
2705-2723	GCUCUUGUCCGUCCAGGTT	903	CCUUGGCACGGAAACAGGCTT	904	AD-15292
2710-2728	UGUUCGGUGGCCAGGCAUUUTT	905	GAUUCGGUGGCCAGGAAACATT	906	AD-15344
2711-2729	GUUCCGUUGCCAGGCAUUCATT	907	UGAAUUGCCUGGCACGGAACTT	908	AD-15254
2712-2730	UUCGGUGGCCAGGCAUUAATT	909	UUCGAAUUGCCUGGCACGGAAATT	910	AD-15345
2715-2733	CGUGGCCAGGCAUUAUCCTT	911	GGAUUGAAUUGCCUGGCACGTT	912	AD-15206
2716-2734	GUGGCCAGGCAUUAUCCUTT	913	AGGAUUGAAUCCUGGCACTT	914	AD-15346
2728-2746	CAAUUCUCAAGGUCCUCCACCTT	915	GGUUGAGACCUUAGGAUUUTT	916	AD-15347
2743-2761	CACCAAGGAGCCAGGAUUCCTT	917	GAUUCUGCCUCCUUGGUGTST	918	AD-9577
2743-2761	cAccAAGGAGGcAGGAuucTST	919	GAUUCUGCCUCCUUGGUGTST	920	AD-9703
2743-2761	CfaCfaAfAGGAGGcAGGAuucTST	921	P-gAaUucfAfAGGAGGcAGGAuucTST	922	AD-14678
2743-2761	CfACfCfAAGGAGCCAGGAuucTST	923	GAUUCUGCCUCCUUGGUGTST	924	AD-14688

2884-2902	UGAUUUAAUGGGAGGCUUAGCTT	967	GCUAAAGCCUCCAUUAAUCATT	968	AD-15404
2885-2903	GAUAAAUGGAGGCUUAGCUTT	969	AGCUAAAGCCAUUAAUCTT	970	AD-15207
2886-2904	AUAAAUGGAGGCUUAGCUTT	971	AAGCUAAAGCCUCCAUUAAUTT	972	AD-15352
2887-2905	UUAAAUGGAGGCUUAGCUTT	973	AAAGCUAAAGCCUCCAUUAAATT	974	AD-15255
2903-2921	UUUCUGGAGGGCAUCUAGCTsT	975	GCUAGAUAGCCAUCCAGAAATsT	976	AD-9603
2904-2921	uuuuuuGAGGAGGAAuGAGGAGCTsT	977	GCuAGAUAGCCAUCCAGAAATsT	978	AD-9729
2904-2922	UUCUGGAGGGCAUCUAGCTsT	979	GCUCUAGAUAGCCAUCCAGAAATsT	980	AD-9599
2904-2922	uuuuGGAuGGCAuGAGGAGCTsT	981	GGCUAGAUAGCCAUCCAGAAATsT	982	AD-9725
2905-2923	UCUGGAGGGCAUCUAGCTsT	983	UGGCuAGAUAGCCAUCCAGAAATsT	984	AD-9621
2905-2923	ucuGGAGGCAuGAGGAGCTsT	985	UGGCuAGAUAGCCAUCCAGAAATsT	986	AD-9747
2925-2943	AGGCUGGGAGACAGGGGGCTT	987	GGCOCACCUUGCUCCAGGCCUTT	988	AD-15405
2926-2944	GGCUGGGAGACAGGGGGCCCTT	989	GGGCCACCUUGCUCCAGGCCUTT	990	AD-15353
2927-2945	GGCUGGGAGACAGGGGGCCCTT	991	GGGCCACCUUGCUCCAGGCCUTT	992	AD-15354
2972-2990	UUCUGGAGGCCACCUUACUTT	993	AGUAAAAGGUGGGCUAGGAATT	994	AD-15406
2973-2991	UCCUGGAGGCCACCUUACUTT	995	GAGUAAAAGGUGGGCUAGGATT	996	AD-15407
2974-2992	CCUGAGGCCACCUUACUTT	997	AGAGUAAAAGGUGGGCUAGGTT	998	AD-15335
2976-2994	UGAGGCCACCUUACUTT	999	GCAGAGUAAAAGGUGGGCUATT	1000	AD-15336
2978-2996	AGCCACCUUACUCUCUTT	1001	GAGCAGAGUAAAAGGUGGGCUUTT	1002	AD-15337
2981-2999	CACCUUACUCUCUCUTT	1003	AUAGAGCAGAGUAAAAGGUGGTT	1004	AD-15269
2987-3005	UACUCUCUCUAGGAGGTsT	1005	CCUCGGCAUAGAGCAGAGUATsT	1006	AD-9565
2987-3005	uAucuGcuuuAuGcAGGtTsT	1007	CCUOGGCAuAGAGCAGAGUATsT	1008	AD-9691

2998-3016	AUGCCAGGCGUGGUAGCATT	1009	UGGUAGCACAGCCUGGCAUTT	1010	AD-15358	12
3003-3021	AGGCUGGUCCUAGCAACACCTT	1011	GGUGUGGUAGCACAGCCUTT	1012	AD-15359	24
3006-3024	CUGUGCUAGCAACACCCAAATT	1013	UUGGGGUUUGGUAGCACAGCTT	1014	AD-15360	13
3010-3028	GCUAGCAACACCCAAAGGUTT	1015	ACCUUÜGGGUUUGGUAGCTT	1016	AD-15219	19
3038-3056	GGAGGCCAUACACCUGGACUTT	1017	AGUCCUAGGUGAUGGCCUCCTT	1018	AD-15361	24
3046-3064	CACCUAGGAGACUGACUGGCTT	1019	GCCGAGUCAGGUCCUAGGUGTT	1020	AD-15273	36
3051-3069	AGGACUGACUCUGGGCAGUGUTT	1021	ACACUGGCCAGUCAGGUCCUTT	1022	AD-15362	31
3052-3070	GGACUGAGCUGGGCAGUGUTT	1023	CACACUGGCCAGUCAGGUCCUTT	1024	AD-15192	20
3074-3092	UGGUUGCAUGGACACUGUCUTT	1025	UGAGACAGUGCAUGGCCATT	1026	AD-15256	19
3080-3098	AUGCACUGUCUCAGCCAACTT	1027	GUUGGCUGAGACAGUGCAUTT	1028	AD-15163	33
3085-3103	CUGUCUCAGCCAACCCGCAUTT	1029	AGGGGGUUGGCUAGAGACAGTT	1030	AD-15364	24
3089-3107	CUCAGCCAAACCCGCUCCACTsT	1031	GUGGAGCGGGUUGGCUAGAGT	1032	AD-9604	35
3089-3107	cucAGccAAccGccGccActTsT	1033	GUQQAGGGGUUGGCUAGAGT	1034	AD-9730	85
3093-3111	GCCAACCCGGCUCCACUACCTsT	1035	GGUAGUGGAGGGGGGUUGGGCT	1036	AD-9527	45
3093-3111	GccAAccGccGccActAccTsT	1037	GGUAGUGGAGGGGGGUUGGGCT	1038	AD-9653	86
3096-3114	AACCCGCUCCACUACCCGGTT	1039	CGGGGUAGUGGAGGGGUUTT	1040	AD-15365	62
3099-3117	CGCUCCACUACCCGGAGTT	1041	CUGCCGGGUAGGUAGGGGGTT	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	CCGGCAGGGUACACAUUTT	1049	GAAUGUGUACCCUGCCGGGUUTT	1050	AD-15257	18

3112-3130	CGGCAGGGUACACAUUCGCTT	1051	GCGAAUGUGUACCCUGCCGTT	1052	AD-15184	50
3114-3132	GCAGGGUACACAUUCGACTT	1053	GUGGAAUGUGUACCCUGCTT	1054	AD-15185	12
3115-3133	CAGGGUACACAUUCGACCTT	1055	GGUGCGAAUGUGUACCCUGTT	1056	AD-15258	73
3116-3134	AGGGUACACAUUCGACCTT	1057	GGGGCGAAUGUGUACCCUTT	1058	AD-15186	36
3196-3214	GGAAUCUAGGCCAGAAACGCTT	1059	GCGUUCUGGCCUAGUUCCCTT	1060	AD-15274	19
3197-3215	GAACUGAGCCAGAAACGCTT	1061	UGCGUUUCUGGCCUAGUUCCTT	1062	AD-15368	7
3198-3216	AACUGAGCCAGAAACGCTT	1063	CUGCGUUUCUGGCCUAGUUUTT	1064	AD-15369	17
3201-3219	UGAGGCCAGAACGAGAUUTT	1065	AAUCUGGUUUCUGGCCUATT	1066	AD-15370	19
3207-3225	AGAAAACGCAGAUUGGGCUGTT	1067	CAGCCCAAUCUGGGUUUCUTT	1068	AD-15259	38
3210-3228	AACGCAGAUUGGGCUGGCTT	1069	AGCCAGCCAAUCUGGGUUTT	1070	AD-15408	52
3233-3251	AGCCAAAGCCUCUUUUACUTT	1071	AGUAAGAAAGGCCUUGGCUTT	1072	AD-9597	23
3233-3251	AG&AAAGCUCUUCUACUTT	1073	AGuAAAGAAGGCCUUGGCUTT	1074	AD-9723	21
3233-3251	AGCtCAAGGtCtUAcUtUAcUTtT	1075	p-AGtUAtAGtAAGtAgGtUtgGtGtUTtT	1076	AD-14680	0,04
3233-3251	AGCtCAAGGtCtUAcUtUAcUTtT	1077	AGUAAAGAAGGCCUUTGtGtUTtT	1078	AD-14690	18
3233-3251	AgCcAaGtGtCuUgtUAcUTtT	1079	p-AGtUAtAGtAAGtAgGtUtgGtGtUTtT	1080	AD-14700	15
3233-3251	AgCcAaGtGtCuUgtUAcUTtT	1081	AGUAAAGAAGGCCUUTGtGtUTtT	1082	AD-14710	15
3233-3251	AGCtCAAGGtCtUAcUtUAcUTtT	1083	AGUAAAGAAGGCCUUTGtGtUTtT	1084	AD-14720	18
3233-3251	AGCtCAAGGtCtUAcUtUAcUTtT	1085	AGUAAAGAAGGCCUUTGtGtUTtT	1086	AD-14730	18
3233-3251	AgCcAaGtGtCuUgtUAcUTtT	1087	AGUAAAGAAGGCCUUTGtGtUTtT	1088	AD-14740	17
3233-3251	UggGtUgtUgtUgtUgtGtAgtGtCtAgtGtCtAgtGtT	1089	p-EGtUgtUgtUgtGtAgtGtCtAgtGtCtAgtGtT	1090	AD-15086	85
3233-3251	UggGtUgtUgtUgtGtAgtGtCtAgtGtCtAgtGtT	1091	GCtUggGtUgtUgtAgtGtAgtGtT	1092	AD-15096	70

3233-3251	UgGuUcCUGAgGAGCCAGCTsT	1093	p-gCnGUCUgUUCUCluCluGlgGAAfCfaTsT	1094	AD-15106	71
3233-3251	UgGuUcCUGAgGAGCCAGCTsT	1095	GCnUfGUCUfCfUfCfUfGAGGAACfCfAfsT	1096	AD-15116	73
3233-3251	UfGGuUfCfUfAfgGAGCCAGCTsT	1097	GCUGGGuCUCuAGGAACcaTsT	1098	AD-15126	71
3233-3251	UfGGuUfCfUfCfUfGAGCCAGCTsT	1099	GCUGGGuCUCuAGGAACcaTsT	1100	AD-15136	56
3233-3251	UgGuUcCUGAgGAGCCAGCTsT	1101	GCUGGGuCUCuAGGAACcaTsT	1102	AD-15146	72
3242-3260	UCUUUUACUUCACCGGGCTT	1103	GGGGGGGAGAGUAGAGAATT	1104	AD-15260	79
3243-3261	CUUCUUACUUACCCGGCUTT	1105	AGCCGGGUAGUAGUAGAAGTT	1106	AD-15371	24
3244-3262	UUCUUACUUACCCGGCUTT	1107	CAGCCGGGUAGUAGAAGATT	1108	AD-15372	52
3262-3280	GGGUCCUCUCAUUUUACGGTT	1109	CCGUAAAAGGGAGGCCCTT	1110	AD-15172	27
3263-3281	GGGUCCUCAUUUUUACGGTT	1111	CCCGUAAAAGGGAGGCCCTT	1112	AD-15295	22
3264-3282	GUCCUCAUUUUACGGGUTT	1113	ACCCGUAAAAAUGGGAGCTT	1114	AD-15373	11
3265-3283	CUCCUCAUUUUACGGGUATT	1115	UACCCGUAAAAAUGGGAGCTT	1116	AD-15163	18
3266-3284	UCCUCAUUUUACGGGUATT	1117	UACCCGUAAAAAUGGGAGTT	1118	AD-15165	13
3267-3285	CCUCAUUUUACGGGUACTT	1119	GUUACCCGUAAAAAUGGGTT	1120	AD-15374	23
3268-3286	CUCAUUUUACGGGUAACTT	1121	UGUUACCCGUAAAAAUGGGTT	1122	AD-15296	13
3270-3288	CAUUUUACGGGUAAACAGUTT	1123	ACUGUUACCCGUAAAAAUGTT	1124	AD-15261	20
3271-3289	AUUUUUACGGGUAAACAGUTT	1125	CACUGUUACCCGUAAAAAATT	1126	AD-15375	90
3274-3292	UUUACGGGUAAACAGUGAGTT	1127	CCUCACGUUACCCGUAAAATT	1128	AD-15296	72
3308-3326	CAGACCAGGAAGCUGGUGTT	1129	CACCGAGCUUCCUGGUUGTT	1130	AD-15376	14
3310-3328	GACCAAGGAAGCUGGUGAGTT	1131	CUCACCGAGCUUCCUGGUUGTT	1132	AD-15377	19
3312-3330	CCAGGAAGGCUCGGUGAGUGTT	1133	CACUCACCGAGCUUCCUGGUUGTT	1134	AD-15409	17

3315-3333	GGAGCUCGGAGUGAUGTT	1135	CAUCACUCACCGAGCUUCCTT	1136	AD-15378
3324-3342	GUGAGUGAUGGAGAACGATT	1137	UCGUUCUGCCAUACUCACTT	1138	AD-15410
3326-3344	GAGGAGUAGGAGAACGAUGTT	1139	CAUCGUUCUGCCAUACUCUTT	1140	AD-15379
3330-3348	GAUGGCAGAACGAUGGCUGTT	1141	CAGGCAUCGUUCUGCCAUCTT	1142	AD-15187
3336-3354	AGAACGAUGGCCUGGAGCATT	1143	UGCCUGCAGGCAUCGUUCUTT	1144	AD-15263
3339-3357	ACGAUGGCCUGGAGGAUGTT	1145	CCAUGCCUGGAGGAUCGUUTT	1146	AD-15264
3348-3366	GCAGGCAUGGAACUUUUUUCTT	1147	AAAAAGGUUCCAUGCCUGCTT	1148	AD-15297
3356-3374	GGAACUUUUUUCGUUAUCATT	1149	UGAUUACGGAAAAAGUUCCTT	1150	AD-15208
3357-3375	GAACUUUUUCCGUUAUCATT	1151	GUGAUUAACGGAAAAAGUUTT	1152	AD-15209
3358-3376	AACUUUUUCCGUUAUCACCTT	1153	GGUGAUUAACGGAAAAAGUUTT	1154	AD-15193
3370-3388	UAUCACCCAGGCCUGAUU CCTT	1155	GAAUCAGGCCUGGGUGAUATT	1156	AD-15380
3378-3396	AGGCCUGAUUCACUGGCCUTT	1157	AGGCCAGUGAAUCAGGCCUTT	1158	AD-15298
3383-3401	UGAUUUCACUGGCCUGGGTT	1159	CCGCCAGGCCAGUGAAUCATT	1160	AD-15299
3385-3403	AUUCACUGGCCUGGGAGTT	1161	CUCCGCCAGUGAAUATT	1162	AD-15265
3406-3424	GCUUUCUAGGCAUGGUUGGTT	1163	CCGACCAUGCCUUAGAACGTT	1164	AD-15381
3407-3425	CUUCUAAGGCAUGGUUGGTT	1165	CCCGACCAUGCCUUAGAAGTT	1166	AD-15210
3429-3447	GAGGGCCAACAACUGUCCCTT	1167	GGGACAGUUUGUUGGCCUC TT	1168	AD-15270
3440-3458	ACUGUCCCUUUGGACTT	1169	GUGCUCAAGGAGGGACAGUTT	1170	AD-9591
3440-3458	AcuGucccucuuGAGcActT	1171	GUGCUCAAGGAGGGACAGUTT	1172	AD-9717
3441-3459	CUGUCCCUUUGGACCTT	1173	GGUGCUCAAGGAGGAGCTT	1174	AD-9622
3441-3459	cuGucccucuuGAGcActT	1175	GGUGCUCAAGGAGGGAGCTT	1176	AD-9748

3480-3498	ACAUUUAUUCUUUUUGGGUCUT ^T	1177	AGACCCAAAAGAUAAAUGUT ^T	1178	AD-	63	49
3480-3498	AcAuuuAucuuuuGGGucu ^T	1179	AGACCCAAAAGAUAAAUGUT ^T	1180	AD-	22	25
3480-3498	AiCAiuUiuAiuiCiuUiuUfGfGfUfUfUT ^T	1181	p- <i>g</i> G <i>a</i> C <i>c</i> C <i>b</i> A <i>f</i> A <i>g</i> A <i>u</i> A <i>f</i> A <i>u</i> G <i>f</i> U <i>T</i> ^T	1182	AD-	9713	19
3480-3498	ACfAUuUfUfAUfCfUuUfUfUfGGfUfCfUf ^T	1183	AGACICfAAAAGAUAAAUGUT ^T	1184	AD-	14679	
3480-3498	T					14689	
3480-3498	AcAuuUauCuuUugGgUcU ^T	1185	p- <i>g</i> G <i>a</i> C <i>c</i> C <i>b</i> A <i>f</i> A <i>g</i> A <i>u</i> A <i>f</i> A <i>u</i> G <i>f</i> U <i>T</i> ^T	1186	AD-	14699	19
3480-3498	AcAuuUauCuuUugGgUcU ^T	1187	AGACICfAAAAGAUAAAUGUT ^T	1188	AD-	14709	
3480-3498	AiCAiuUiuAiuiCiuUiuUfGfGfUfUfUT ^T	1189	AGACCCaaAAGAUAAAUGUT ^T	1190	AD-	14719	21
3480-3498	ACfAUuUfUfAUfCfUuUfUfUfGGfUfCfUf ^T	1191	AGACCCaaAAGAUAAAUGUT ^T	1192	AD-	14729	23
3480-3498	AcAuuUauCuuUugGgUcU ^T	1193	AGACCCaaAAGAUAAAUGUT ^T	1194	AD-	14739	24
3480-3498	GfC <i>a</i> Uf <i>e</i> U <i>f</i> C <i>b</i> U <i>g</i> C <i>c</i> G <i>d</i> G <i>e</i> C <i>f</i> T ^T	1195	p- <i>g</i> G <i>e</i> U <i>f</i> C <i>b</i> G <i>c</i> A <i>g</i> C <i>f</i> G <i>a</i> U <i>g</i> G <i>f</i> T ^T	1196	AD-	15085	74
3480-3498	GCTfAUfCfUfUfCfUfCfUfCfGAGCfCf ^T	1197	GGCTfUfCfUfCfGAGCfAGfAGAUfGGCT ^T	1198	AD-	15095	60
3480-3498	GcCaUcUgCuGcGqGcC ^T	1199	p- <i>g</i> G <i>e</i> U <i>f</i> C <i>b</i> G <i>c</i> A <i>g</i> C <i>f</i> G <i>a</i> U <i>g</i> G <i>f</i> T ^T	1200	AD-	15105	33
3480-3498	GcCaUcUgCuGcGqGcC ^T	1201	GGCUfUfCfUfCfGAGCfAGfAGAUfGGCT ^T	1202	AD-	15115	30
3480-3498	GfC <i>a</i> Uf <i>e</i> U <i>f</i> C <i>b</i> U <i>g</i> C <i>c</i> G <i>d</i> G <i>e</i> C <i>f</i> T ^T	1203	GGCUfUfCfUfCfGAGCfAGfAGAUfGGCT ^T	1204	AD-	15125	54
3480-3498	GCTfAUfCfUfUfCfUfCfUfCfGAGCfCf ^T	1205	GGCUfUgCuGcGqGAGCAGAUfGGCT ^T	1206	AD-	15135	51
3480-3498	GcCaUgCuGcGqGcC ^T	1207	GGCUfUgCuGcGqGAGCAGAUfGGCT ^T	1208	AD-	15145	49
3480-3499	CAUUUAUCUUUUUGGGUCUGT ^T	1209	CAGACCCAAAAGAUAAAUGCT ^T	1210	AD-	9578	
3480-3499							
3481-3499	cAuuuAucuuuuGGGucu ^T	1211	cAGACCCAAAAGAUAAAUGCT ^T	1212	AD-	111	
3485-3503	UAUCUUUUUGGUUCUGUCCU ^T	1213	AGGACAGCCCCAAAAGAUAT ^T	1214	AD-	9704	66
3485-3503	uAucuuuuGGGucuGuccu ^T	1215	AGGACAGCCCCAAAAGAUAT ^T	1216	AD-	9558	
3504-3522	CUCUGUUGCCUUUUACAGT ^T	1217	CUGUAAAAGGCAACAGAGT ^T	1218	AD-	9684	63
3504-3522						9634	30

ES 2 392 478 T3

3531-3549	ucuAGaccuGnuuuGcuuuTst	1261	AAAAGAAAAAcAGGUCAAGATst	1262	AD-9679															21
3531-3549	UfcUfaGfaCfcUfgeUfuUfuGfuUfUfTsT	1263	p-AfAfGfcAfAfAfAfGfgeUfuGfaTsT	1264	AD-14675															11
3531-3549	UICfUfAGACfCfUfCfUfUfUfUfUfUfUfUfTsT	1265	AAAGCTAAAACfAGGUfCfUfAGATst	1266	AD-14685														19	
3531-3549	UcUaGacCUGUuUuGcUuUuUfTsT	1267	p-AfAfGfcAfAfAfAfGfgeUfuGfaTsT	1268	AD-14695														12	
3531-3549	UcUaGacCUGUuUuGcUuUuUfTsT	1269	AAAGCTAAAACfAGGUfCfUfAGATst	1270	AD-14705														16	
3531-3549	UfcUfaGfaCfcUfgeUfuUfuUfUfUfTsT	1271	AAAAGCaaaAAGGUfCfUfAgatst	1272	AD-14715														19	
3531-3549	UICfUfAGACfCfUfCfUfUfUfUfUfUfUfTsT	1273	AAAGCaaaAAGGUfCfUfAgatst	1274	AD-14725														19	
3531-3549	UcUaGacCUGUuUuGcUuUuUfTsT	1275	AAAAGCaaaAAGGUfCfUfAgatst	1276	AD-14735														19	
3531-3549	UfcUfaGfGfCfUfGfAgUfUfUfUfUfTsT	1277	p-AfAfAfAfCfAfGfcfuAfufGfaTsT	1278	AD-15081														30	
3531-3549	UICfUfAGGCfCfUfGGACUfUfUfUfUfTsT	1279	AUfAAACfUfCfAGGGCfCfUfAUfGATst	1280	AD-15091														16	
3531-3549	UcAuAgaGcUgGAgUuUuUfTsT	1281	p-AfAfAfCfAfGfcfuAfufGfaTsT	1282	AD-15101														16	
3531-3549	UcAuAgaGcUgGAgUuUuUfTsT	1283	AUfAAACfUfCfAGGGCfCfUfAUfGATst	1284	AD-15111														11	
3531-3549	UfcUfaGfGfCfUfGfAgUfUfUfUfTsT	1285	AUAAAACUCCagGCCUfAugaTsT	1286	AD-15121														19	
3531-3549	UICfUfAGGCfCfUfGGACUfUfUfUfUfTsT	1287	AUAAAACUCCagGCCUfAugaTsT	1288	AD-15131														17	
3531-3549	UcAUAGGCUgAgUuUuUfTsT	1289	AUAAAACUCCagGCCUfAugaTsT	1290	AD-15141														18	
3557-3575	UGAAAGAUUUUUUCUGGst	1291	CCCAAGAAUAAAUAUCUUCATst	1292	AD-9626														68	
3557-3575	UcAAAGAUAAAUAUCUUCGGTsT	1293	CCcAGAAUAAAUAUCUUCATst	1294	AD-9752														33	
3570-3588	UCUUGGGUUUUUGUAGCAUfUfTsT	1295	AAAUGCUfACAAAACCCAGATst	1296	AD-9629														24	
3570-3588	ucuGGGuuuuGAGcAuuuTsT	1297	AAAUGCUfACAAAACCCAGATst	1298	AD-9755														29	
3613-3631	AUAAAAACAAAACACGUUfT	1299	AAACGUUfGUUfGUUfGUUfAUfT	1300	AD-15412														21	
3617-3635	AAACAAAACACGUUfGUUfCTT	1301	GGACAAACGUUfGUUfGUUfTT	1302	AD-15211														73	

3618-3636	AACAAACAAAACGUUGUCCUTT	1303	AGGACACCGUUUUUUUUUUTT	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') ¹	SEQ ID NO:	Secuencia de hebra antisentido (5'-3') ¹	SEQ ID NO:	ARNm resistente en el % de controles a conc. de ARNm de 30 nM
AD-10792	GccuGGAGuuAuuGGAAATsT	1305	UUCGGAAuAAAUCUCCAGGCTsT	1306	15
AD-10793	GccuGGAGuuAuuGGAAATsT	1307	uUccGAuAuuAACUccAGGCTsT	1308	32
AD-10796	GccuGGAGuuAuuGGAAATsT	1309	UUCGGAAuAAAUCUCCAGGCTsT	1310	13
AD-12038	GccuGGAGuuAuuGGAAATsT	1311	uUCCGAuAuuAAAUCUCCAGGCTsT	1312	13
AD-12039	GccuGGAGuuAuuGGAAATsT	1313	UuCCGAuAuuAAAUCUCCAGGCTsT	1314	29
AD-12040	GccuGGAGuuAuuGGAAATsT	1315	UUCGAuAuuAAAUCUCCAGGCTsT	1316	10
AD-12041	GccuGGAGuuAuuGGAAATsT	1317	UUCGAuAuuAAAUCUCCAGGCTsT	1318	11
AD-12042	GCCUGGAGGUUUUUTUCGGAAATsT	1319	uUCCGAuAuuAAAUCUCCAGGCTsT	1320	12
AD-12043	GCCUGGAGGUUUUUTUCGGAAATsT	1321	UuCCGAuAuuAAAUCUCCAGGCTsT	1322	13
AD-12044	GCCUGGAGGUUUUUTUCGGAAATsT	1323	UUCGAuAuuAAAUCUCCAGGCTsT	1324	7
AD-12045	GCCUGGAGGUUUUUTUCGGAAATsT	1325	UUCGAuAuuAAAUCUCCAGGCTsT	1326	8
AD-12046	GccuGGAGuuAuuGGAA	1327	UUCGGAAuAAAUCUCCAGGcsu	1328	13
AD-12047	GccuGGAGuuAuuGGAA	1329	UUCGGAAuAAAUCUCCAGGcsu	1330	17
AD-12048	GccuGGAGuuAuuGGAAAA	1331	UUUUCCGAuAAAACUCCAGGcsu	1332	43
AD-12049	GccuGGAGuuAuuGGAAAAAG	1333	CUTUUCGGAAuAAAACUCCAGGcsu	1334	34
AD-12050	GccuGGAGuuAuuGGAAATTab	1335	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTTab	1336	16
AD-12051	GccuGGAGuuAuuGGAAATTab	1337	UUUCGGAAuAAAACUCCAGGCTTab	1338	31
AD-12052	GccuGGAGuuAuuGGAAAAATTab	1339	UUUUCCGAuAAAACUCCAGGCTTab	1340	81
AD-12053	GccuGGAGuuAuuGGAAAAAGTTab	1341	CUTUUCGGAAuAAAACUCCAGGCTTab	1342	46
AD-12054	GCCUGGAGGUUUUUTUCGGAAATsT	1343	UUCGGAAuAAAACUCCAGGcsu	1344	8
AD-12055	GccuGGAGuuAuuGGAAATsT	1345	UUCGGAAuAAAACUCCAGGcsu	1346	13
AD-12056	GcCuGGAGUuUuUuCgGaaA	1347	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTTab	1348	11
AD-12057	GcCuGGAGUuUuUuCgGaaA	1349	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTsT	1350	8
AD-12058	GcCuGGAGUuUuUuCgGaaA	1351	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTsT	1352	9
AD-12059	GcCuGGAGUuUuUuCgGaaA	1353	uUccGAuAAAACUCCAGGCTsT	1354	23
AD-12060	GcCuGGAGUuUuUuCgGaaA	1355	UUCGGaaUAAAUCUCCAGgc	1356	10

AD-12061	GcCuGgnAgUuUuUuCgGaATsT	1357	UUCGGaaUAAAUCUCCAGgcTsT	1358	7
AD-12062	GcCuGgAgUuUuUuCgGaATTab	1359	UUCGGaaUAAAUCUCCAGgcTTab	1360	10
AD-12063	GcCuGgAgUuUuUuCgGaA	1361	UUCGGaaUAAAUCUCCAGgcscu	1362	19
AD-12064	GcCuGgnAgUuUuUuCgGaATsT	1363	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTsT	1364	15
AD-12065	GcCuGgAgUuUuUuCgGaATTab	1365	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTTab	1366	16
AD-12066	GcCuGgAgUuUuUuCgGaA	1367	UUCGGAAuAAAACUCCAGGcsu	1368	20
AD-12067	GcCuGgnAgUuUuUuCgGaATsT	1369	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTsT	1370	17
AD-12068	GcCuGgAgUuUuUuCgGaATTab	1371	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTTab	1372	18
AD-12069	GcCuGgAgUuUuUuCgGaA	1373	UUCGGAAuAAAACUCCAGGcsu	1374	13
AD-12338	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAf	1375	P-uUfcCfgeAfafUfaAfafCfuCfcAfAgGfc	1376	15
AD-12339	GcCuGgAgUuUuUuCgGaA	1377	P-uUfcCfgeAfafUfaAfafCfuCfcAfAgGfc	1378	14
AD-12340	GccuGAGGwuAwucGGAA	1379	P-uUfcCfgeAfafUfaAfafCfuCfcAfAgGfc	1380	19
AD-12341	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAfTsT	1381	P-uUfcCfgeAfafUfaAfafCfuCfcAfAgGfcTsT	1382	12
AD-12342	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAfTsT	1383	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTsT	1384	13
AD-12343	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAfTsT	1385	uUccGGAuAAAACUccAGGCTsT	1386	24
AD-12344	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAfTsT	1387	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTsT	1388	9
AD-12345	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAfTsT	1389	UUCGGAAuAAAACUCCAGGcsu	1390	12
AD-12346	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAfTsT	1391	UUCGGaaUAAAUCUCCAGgcsu	1392	13
AD-12347	GCCUGGAGUUUuUUCGGAAATsT	1393	P-uUfcCfgeAfafUfaAfafCfuCfcAfAgGfcTsT	1394	11
AD-12348	GccuGAGGwuAwucGGAAATsT	1395	P-uUfcCfgeAfafUfaAfafCfuCfcAfAgGfcTsT	1396	8
AD-12349	GcCuGgnAgUuUuUuCgGaATsT	1397	P-uUfcCfgeAfafUfaAfafCfuCfcAfAgGfcTsT	1398	11
AD-12350	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAfTsT	1399	P-uUfcCfgeAfafUfaAfafCfuCfcAfAgGfcTTab	1400	17
AD-12351	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAf	1401	P-uUfcCfgeAfafUfaAfafCfuCfcAfAgGfcscfSu	1402	11
AD-12352	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAf	1403	UUCGGaaUAAAUCUCCAGgcsu	1404	11
AD-12354	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAf	1405	UUCGGAAuAAAACUCCAGGcsu	1406	11
AD-12355	GfcCfuGfgAgUfuUfuUfuCfgeGfaAf	1407	UUCGGAAuAAAACUCCAGGCTsT	1408	9

AD-12383	GGCUUGGAGUUUAUUCGGAAATsT	1461	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsT	1462	7
AD-12384	GccuGGAGuuuAuwGGAAATsT	1463	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsT	1464	8
AD-12385	GcCuGgnAgUuUuUuCgGAAATsT	1465	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsT	1466	8
AD-12386	GtcCfuGfgAfgUfuUfuUfuCgGfaAf	1467	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsT	1468	11
AD-12387	GcICfuGGAGGUfuUfuUfuCfGGA	1469	UfUICfCfGAAUAAACUfCfAGGGfCsCsUF	1470	13
AD-12388	GcICfuGGAGGUfuUfuUfuCfGGA	1471	P-UUUCGCGAAUAAACUfCfAfGfCf	1472	19
AD-12389	GcICfuGGAGGUfuUfuUfuUfCfGGA	1473	P-UUUCGCGAAUAAfCfAfGfCfCsCsU	1474	16
AD-12390	GcICfuGGAGGUfuUfuUfuCfGGA	1475	UUCCGAAUAAAACUCCAGGGscsU	1476	17
AD-12391	GcICfuGGAGGUfuUfuUfuUfCfGGA	1477	UUCCGAAuAAAaCUCCAGgc	1478	21
AD-12392	GcICfuGGAGGUfuUfuUfuUfCfGGA	1479	UUCCGAAUAAAACUCCAGGGCTsT	1480	28
AD-12393	GcICfuGGAGGUfuUfuUfuUfCfGGA	1481	UUCCGAAuAAAACUCCAGGGCTsT	1482	17
AD-12394	GcICfuGGAGGUfuUfuUfuUfCfGGA	1483	uUcCGAAuAAAACUcCAGGCTsT	1484	75
AD-12395	GmocCmouGmogAmogUmuoUmuoAtTsT	1485	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsCsUF	1486	55
AD-12396	GmocCmouGmogAm02gUmuoUmuoGmogaA	1487	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsCsUF	1488	59
AD-12397	GfcCfuGfgAfgUfuUfuUfuCfGfaAf	1489	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsCsUF	1490	20
AD-12398	GtcCfuGfgAfgUfuUfuUfuCgGfaATsT	1491	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsCsUF	1492	11
AD-12399	GcCuGgnAgUuUuUuCgGAAATsT	1493	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsCsUF	1494	13
AD-12400	GCCUGGGAGUTUAUUCGGAAATsT	1495	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsCsUF	1496	12
AD-12401	GccuGGAGuuuAuwGGAAATsT	1497	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsCsUF	1498	13
AD-12402	GccuGGAGuuuAuwGGAA	1499	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsCsUF	1500	14
AD-12403	GcICfuGGAGGUfuUfuUfCfGGA	1501	P-UUUCGCGAAUAAACUUCGCGCTsCsUF	1502	4
AD-9314	GGCUUGGAGUTUAUUCGGAAATsT	1503	UUCCGAAUAAAACUCCAGGGCTsT	1504	9

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; moc, mu, 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 fosfodiéster, 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:

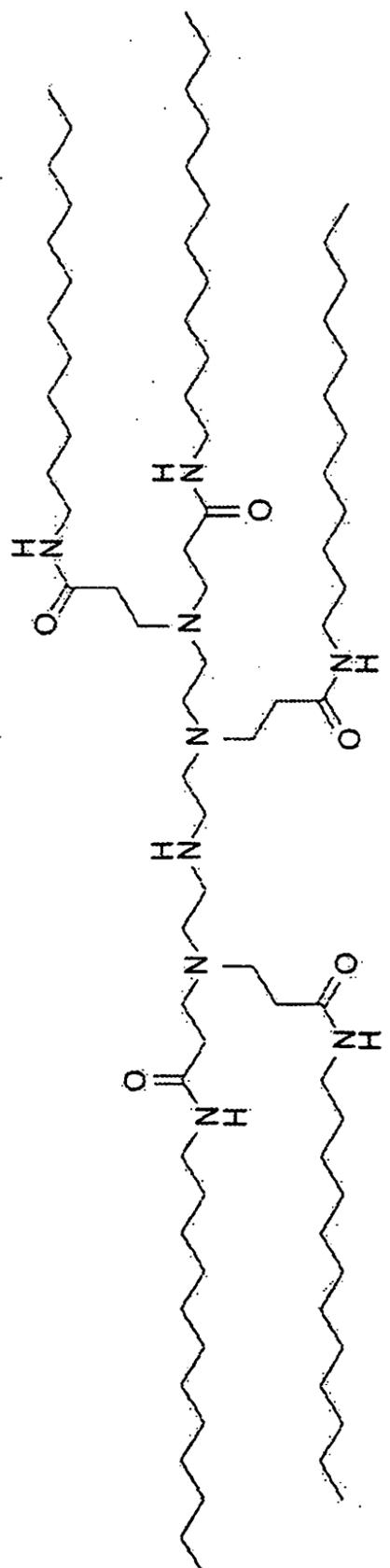
- 5 1. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de un gen PCSK9 humano en una célula, comprendiendo dicho ARNbc al menos dos secuencias que son complementarias entre sí y en el que una hebra sentido comprende una primera secuencia y una hebra antisentido comprende una segunda 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.
- 15 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.
 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

5. 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:
- 10 (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
- 15 (b) dicha primera secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 1227 y dicha segunda secuencia es la secuencia de SEQ ID NO: 1228.
- 20 2. ARNbc según la reivindicación 1, comprendiendo dicho ARNbc al menos un nucleótido modificado.
- 25 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 colesterol 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.
- 30 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.
- 35 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 trascripto de ARNm del gen PCSK9, inhibiendo de ese modo la expresión del gen PCSK9 en la célula.
- 40 6. ARNbc para tratar, prevenir o gestionar procesos patológicos que pueden mediarse 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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

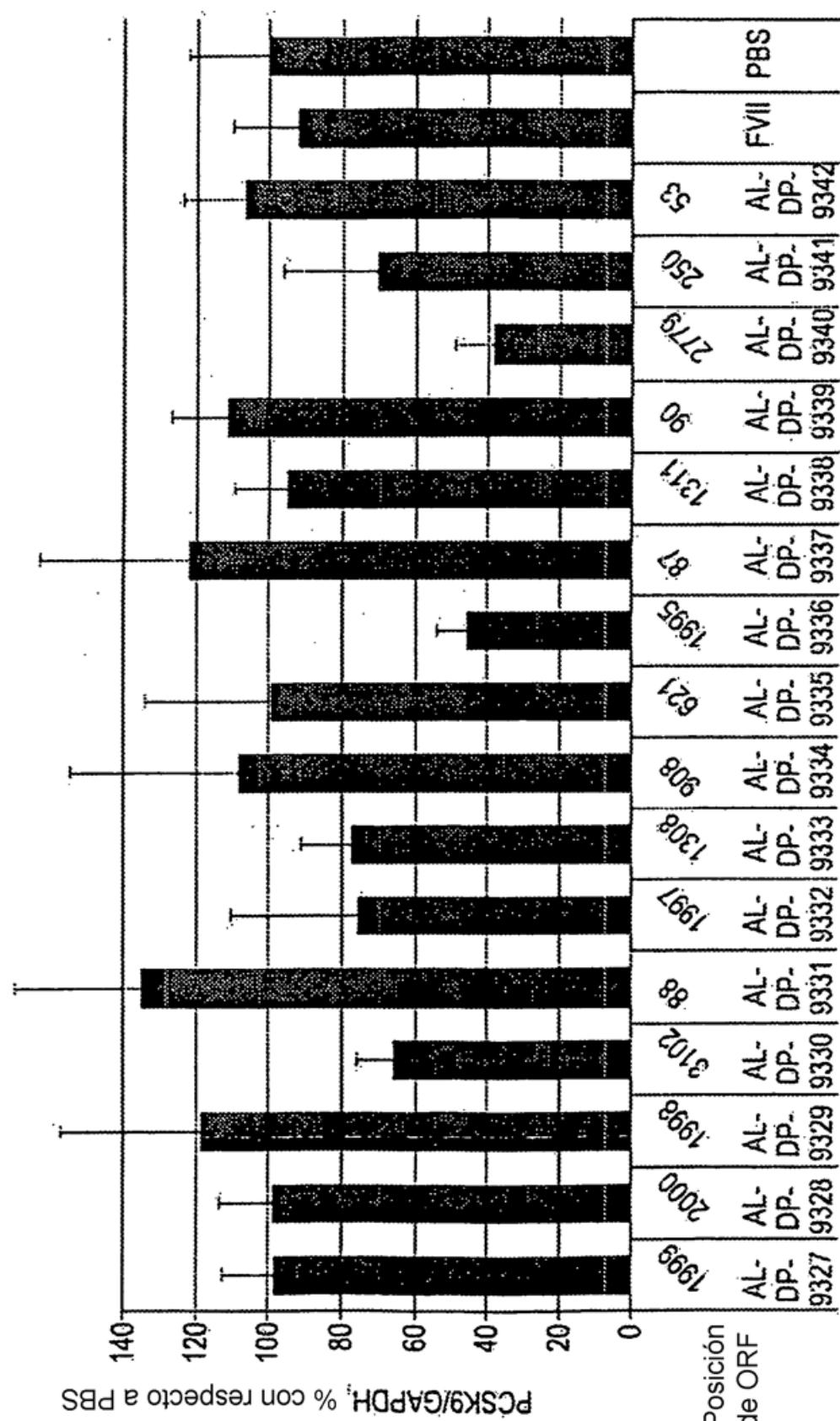


FIG. 2

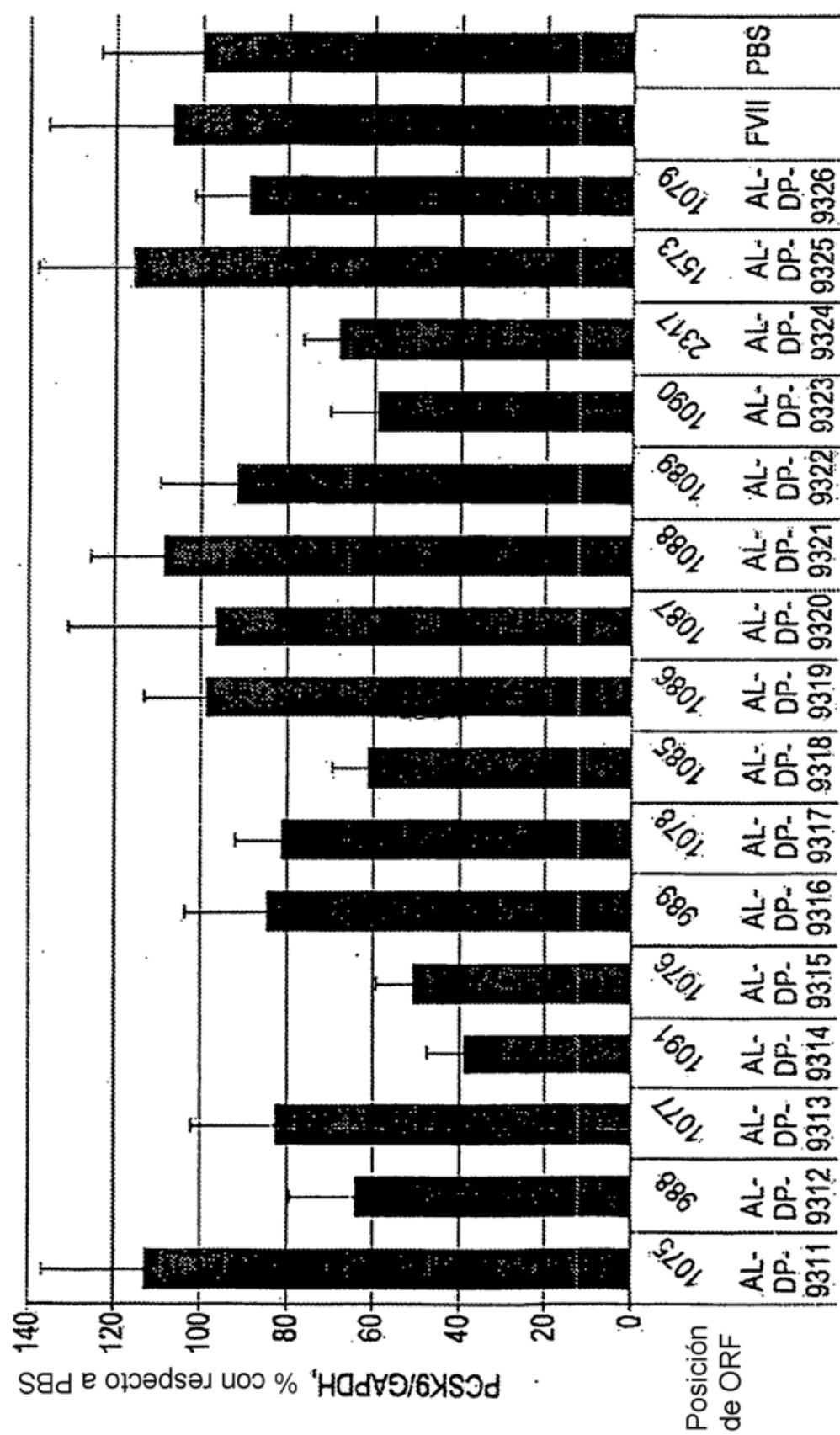


FIG. 3

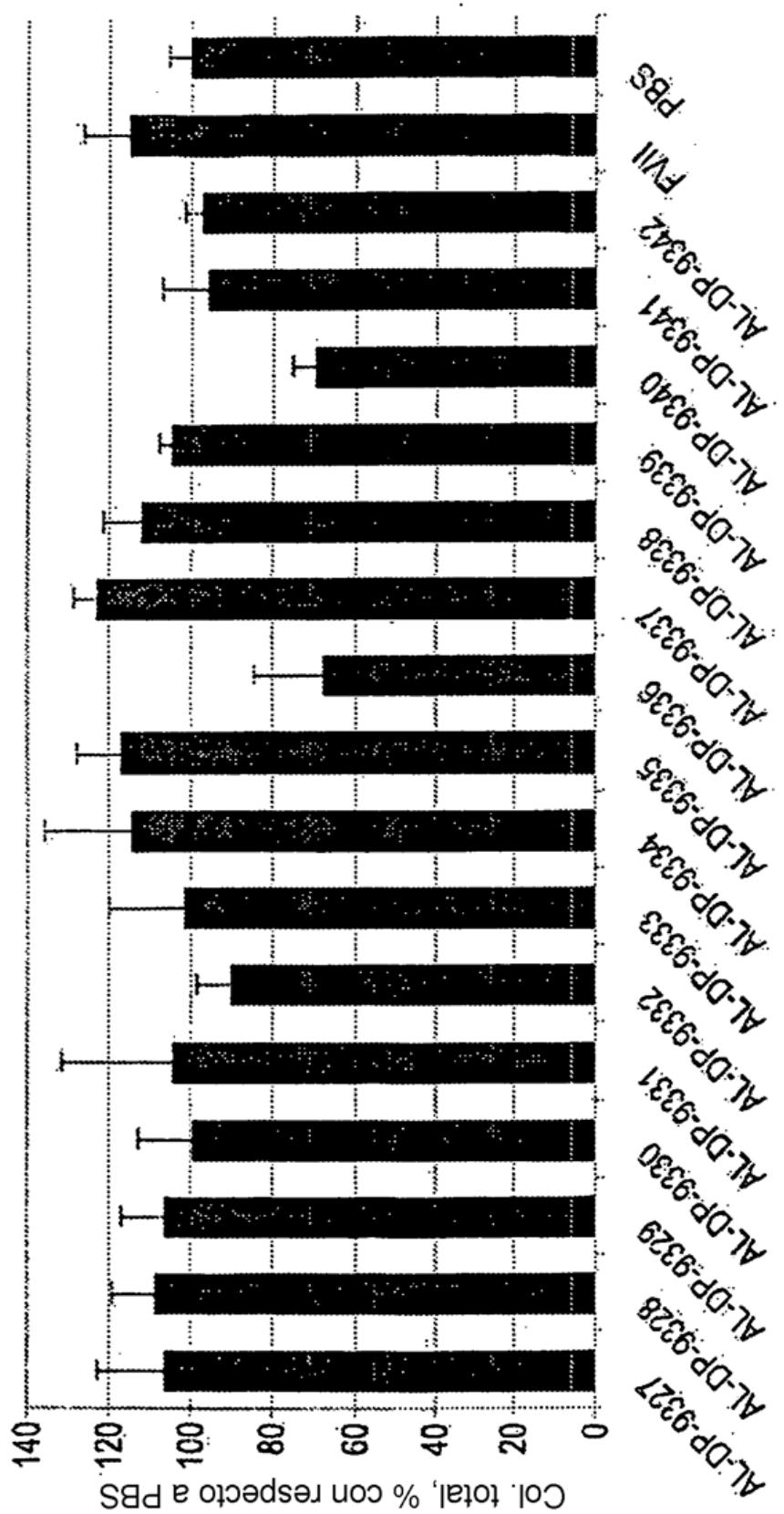


FIG. 4

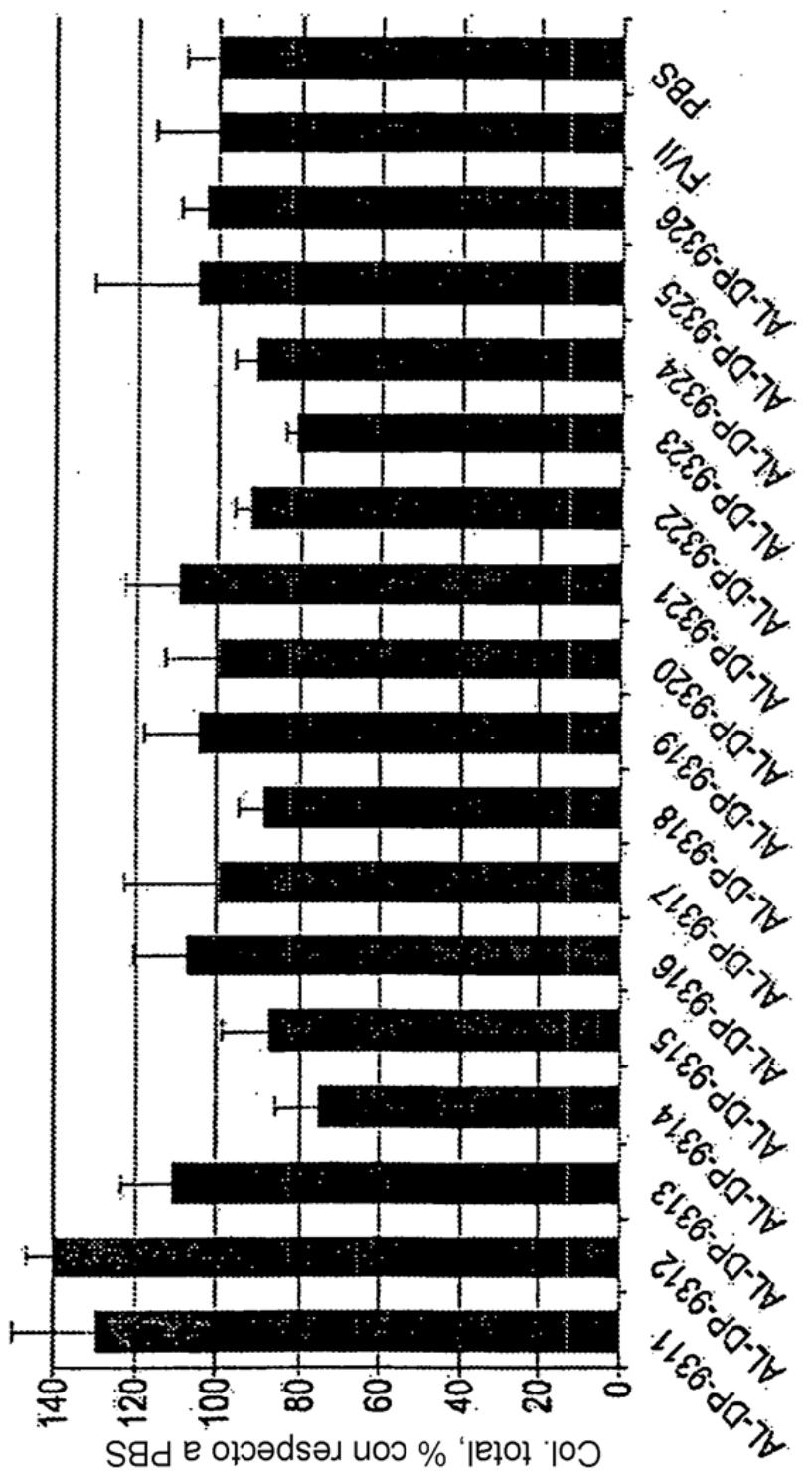
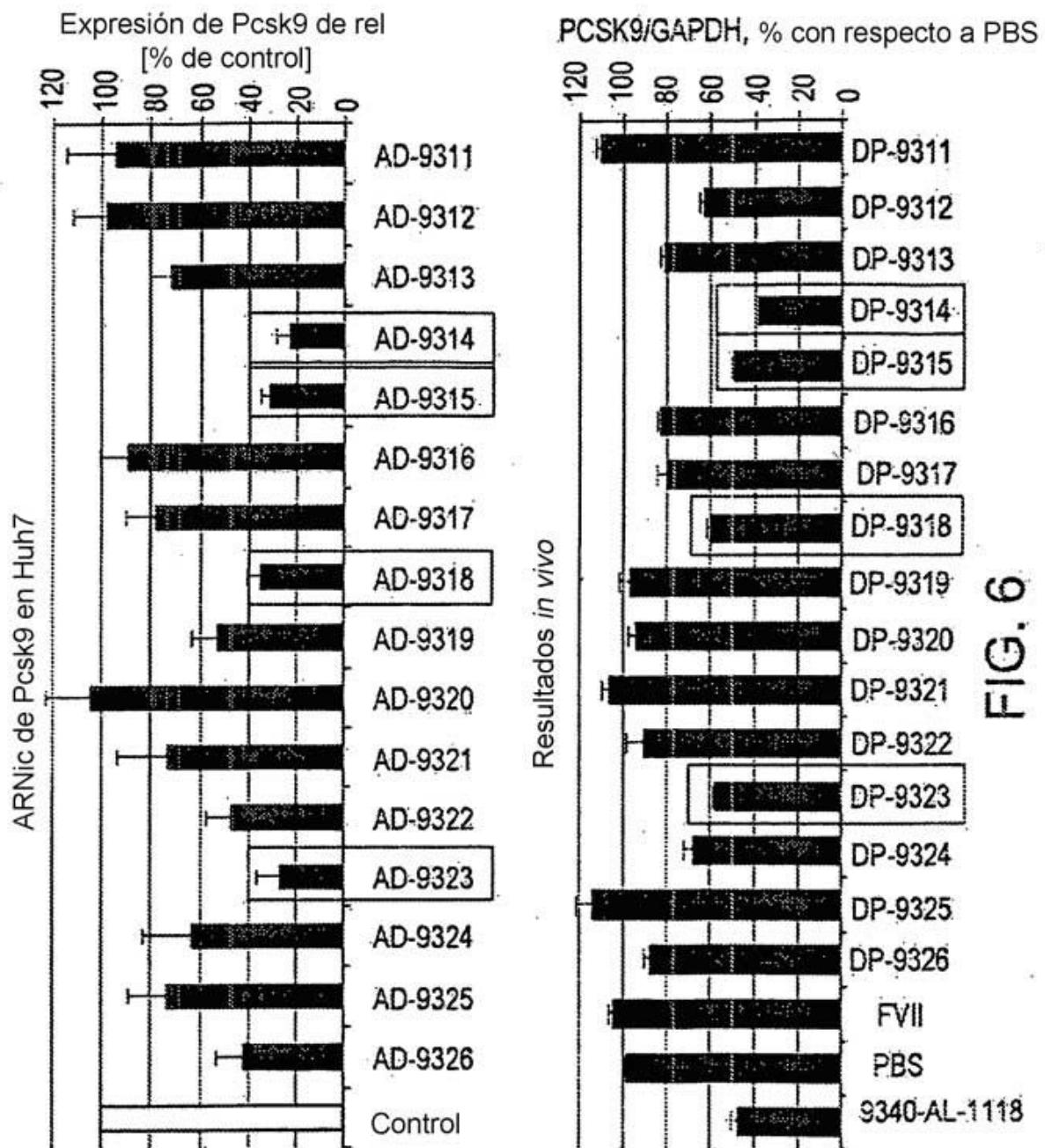


FIG. 5



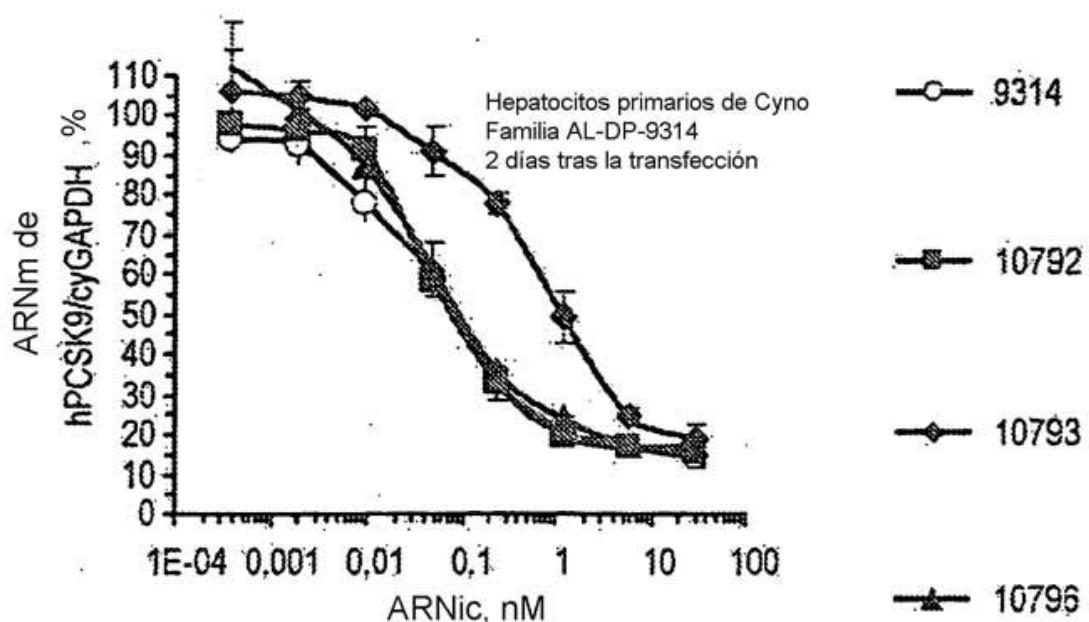


FIG. 7A

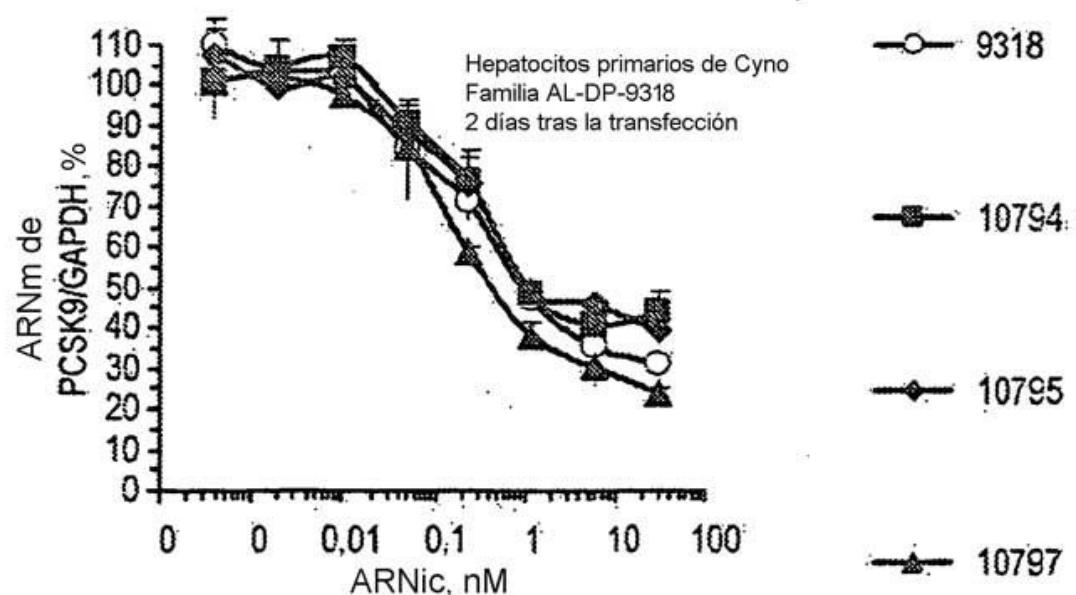
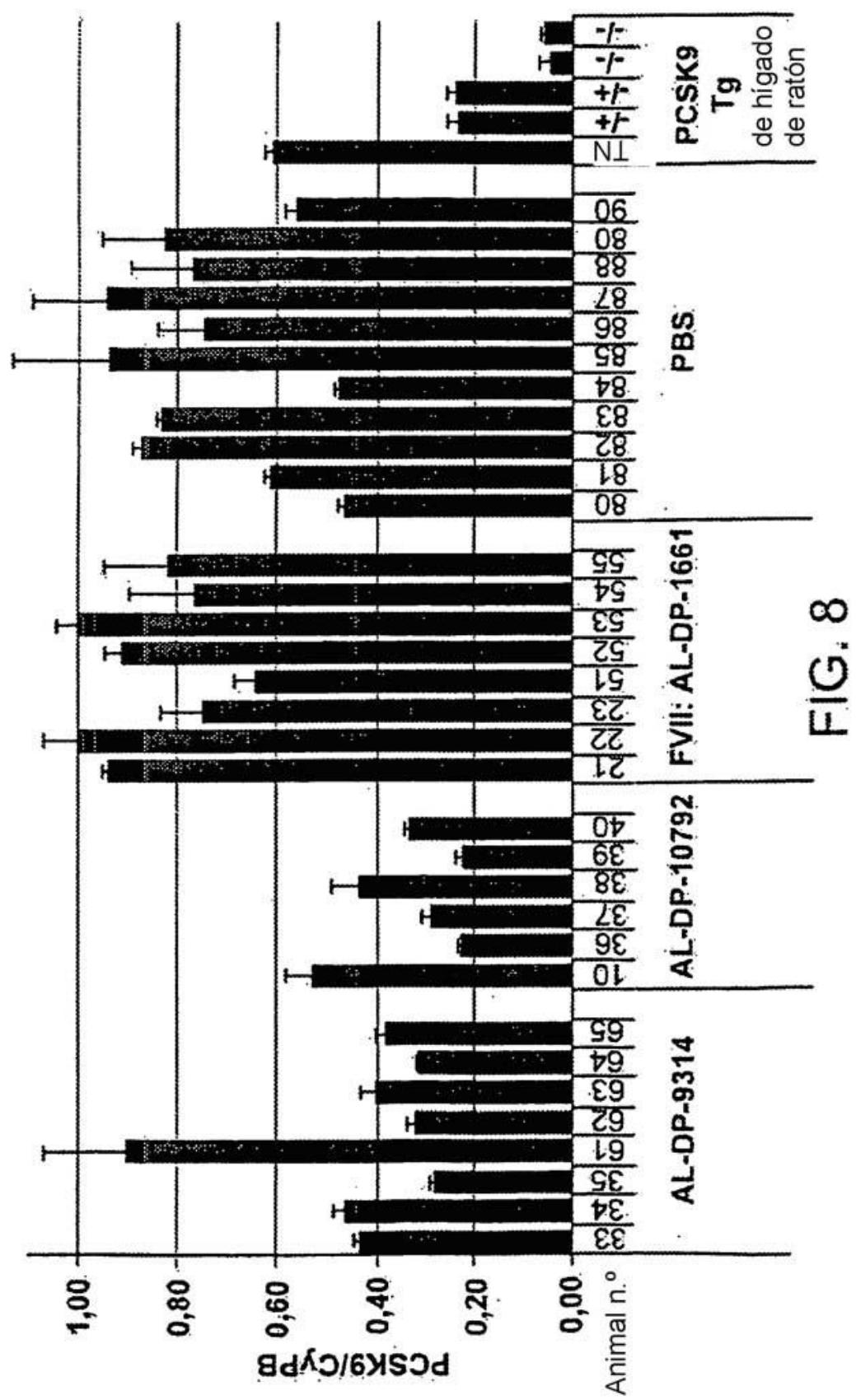


FIG. 7B



8
E

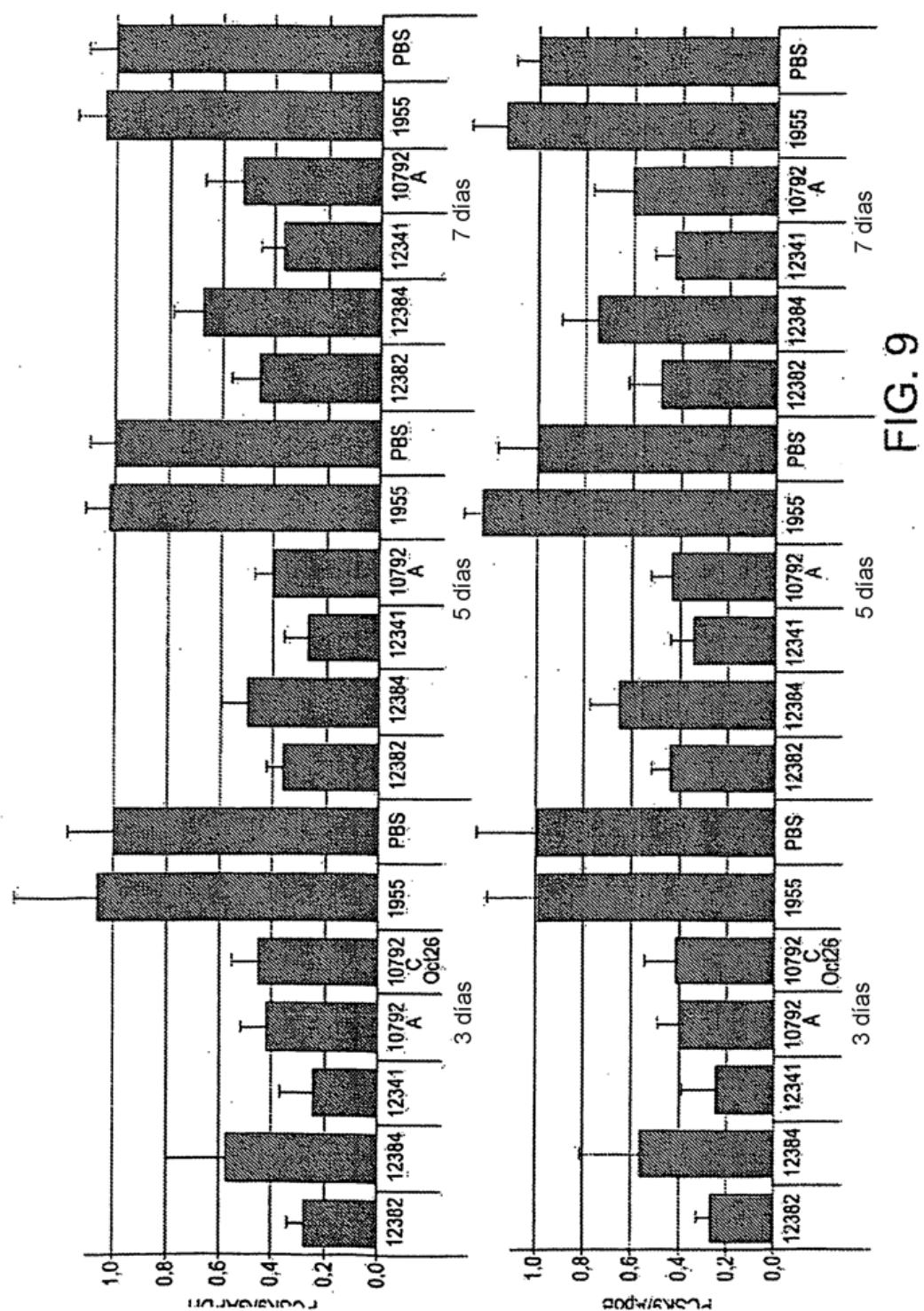


FIG. 9