

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 661**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2007 E 07813825 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012 EP 2057177**

54 Título: **Composiciones y sus usos dirigidos a la diacilglicerol aciltransferasa 1**

30 Prioridad:

04.08.2006 US 821511 P

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

08.03.2013

73 Titular/es:

**ISIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
2855 Gazelle Court
CARLSBAD, CA 92010, US**

72 Inventor/es:

**YU, XING-XIAN;
BHANOT, SANJAY y
MONIA, BRETT, P.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 397 661 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 sus usos dirigidos a la diacilglicerol aciltransferasa 1

Listado de secuencias

5 La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado DIBIS0088WBOSEQ.txt, creado el 6 de agosto del 2007 con un tamaño de 72 Kb. La información en el formato electrónico del listado de secuencias se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Antecedentes de la invención

10 La mala regulación de la diacilglicerol aciltransferasa 1 puede desempeñar un papel en el desarrollo de la obesidad. Después de la diferenciación de células 3T3-L1 de ratón en adipocitos maduros, se observan niveles de diacilglicerol aciltransferasa I aumentados 90 veces. Sin embargo, la sobre expresión forzada de la diacilglicerol aciltransferasa 1 en adipocitos maduros sólo produce un aumento de 2 veces en los niveles de diacilglicerol aciltransferasa 1. Esto conduce a un aumento en la síntesis de triglicéridos celular sin un aumento simultáneo en la lipólisis de triglicéridos, lo que sugiere que la manipulación del nivel de estado estacionario de la diacilglicerol aciltransferasa I puede ofrecer un medio posible para tratar la obesidad (Yu y col., J. Biol Chem., 277, 50876-50884 (2002)).

15 En una población turca aleatoria, se han identificado cinco polimorfismos en la secuencia no codificante 5' y promotora de la diacilglicerol aciltransferasa 1 humana. Una variante común, la C79T, reveló actividad promotora reducida para el alelo 79T y está asociada con un índice de masa corporal más bajo, niveles de colesterol HDL mas altos en plasma y una tensión arterial diastólica más baja en mujeres turcas (Ludwig y col., Clin. Genet., 62, 68-73 (2002)).

20 Ratones *knockout* con el gen diacilglicerol aciltransferasa 1 desactivado presentan fenotipos de interés que indican la inhibición de la diacilglicerol aciltransferasa como un posible tratamiento para la obesidad y la resistencia a insulina asociada con la obesidad. Los ratones sin diacilglicerol aciltransferasa 1 son viables y aún pueden sintetizar triglicéridos a través de otras rutas biológicas. Aunque los ratones son magros y resistentes a obesidad inducida por la dieta (Smith y col., Nat. Genet., 25, 87-90 (2000)), han disminuido los niveles de triglicéridos tisulares y han aumentado la sensibilidad a la insulina y a la leptina (Chen y col., J. Clin. Invest., 109, 1049-1055 (2002)). Las estrategias con moléculas pequeñas para modular la síntesis de la diacilglicerol aciltransferasa I son ineficaces. (Tabata y col., Phytochemistry, 46, 683-687 (1997); Tomoda y col., J. Antibiot. (Tokio), 52, 689-694 (1999)).

25 La diacilglicerol transferasa 2 posee actividad de diacilglicerol transferasa que utiliza un amplia serie de sustratos de acil-CoA grasos de cadena larga (Cases y col., J. Biol. Chem., 276, 38870-38876 (2001); Lardizabal y col., J. Biol Chem., 276, 38862-38869 (2001)). La diacilglicerol transferasa 2 es un miembro de una familia de genes cuyas secuencias no están relacionadas con la diacilglicerol aciltransferasa 1. (Cases y col., J.Biol. Chem., 276, 38870-38876 (2001)).

30 De manera preferente, el ARNm de la diacilglicerol transferasa 2 se regula por incremento mediante tratamiento con insulina, como se demuestra mediante ensayos *in vitro* que miden la actividad diacilglicerol de la fracción de membrana de adipocitos de ratón cultivados. En ratones en ayunas, la expresión de la diacilglicerol transferasa 2 se reduce enormemente, y tras volver a alimentar, aumenta drásticamente. Los modelos de expresión de dos enzimas que participan en la síntesis de ácidos grasos, la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintasa, responden al ayuno y a la realimentación de una manera similar. Estos resultados, junto con la observación de que la diacilglicerol transferasa 2 se expresa abundantemente en el hígado, sugieren que la diacilglicerol transferasa 2 está estrechamente relacionada con la ruta de la síntesis de ácidos grasos endógenos (Meegalla y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 298, 317-323 (2002)).

35 Estudios realizados con ratones que llevan una alteración en el gen de la diacilglicerol aciltransferasa 1 proporcionan pruebas de que la diacilglicerol aciltransferasa 2 contribuye a la síntesis de triglicéridos. Los niveles de expresión de ARNm de la diacilglicerol transferasa 2 son similares en segmentos intestinales tanto de ratones con déficit de diacilglicerol transferasa 1 como de tipo natural. Usando cloruro de magnesio para diferenciar entre la actividad diacilglicerol transferasa 1 y 2, Buhman y col. observaron que, en ratones con déficit de diacilglicerol transferasa 1, la actividad diacilglicerol transferasa se reducía al 50% en el intestino proximal y al 10-15% en el intestino distal (Buhman y col., J. Biol Chem., 277, 25474-25479 (2002)).

40 Adicionalmente, los niveles de ARNm de la diacilglicerol transferasa 2 no se regulan por incremento en el tejido hepático o adiposo de los ratones con déficit de diacilglicerol transferasa 1, incluso semanas después de una dieta rica en grasas. Sin embargo, en ratones ob/ob, que tienen una mutación en el gen de leptina que produce obesidad, la diacilglicerol transferasa 2 se expresa a niveles más altos que en los ratones de tipo natural, lo que sugiere que la diacilglicerol transferasa 2 puede ser parcialmente responsable de la masa grasa altamente acumulada observada en estos ratones. Adicionalmente, las mutaciones combinadas de la leptina y de la diacilglicerol transferasa 1 conducen a una elevación de tres veces en la expresión de la diacilglicerol transferasa 2 en tejido adiposo blanco, en comparación con los niveles, en los mismos tejidos, de ratones con déficit en diacilglicerol transferasa 1. Estos datos

sugieren que la leptina normalmente regula negativamente la expresión de la diacilglicerol transferasa 2 y que la regulación positiva de la diacilglicerol transferasa 2 en tejido adiposo blanco en estos ratones puede proporcionar una ruta alternativa para la síntesis de triglicéridos que aún se produce en ratones con déficit en leptina/diacilglicerol transferasa 1 (Chen y col., J. Clin. Invest., 109, 1049-1055 (2002); Cases y col., J. Biol Chem., 276, 38870-38876 (2001); Chen y col., J. Clin. Invest., 109, 175-181 (2002)).

La fibrosis hepática es la acumulación excesiva de proteínas de la matriz extracelular que se produce en muchos tipos de enfermedades hepáticas crónicas. La fibrosis hepática avanzada da lugar a complicaciones tales como cirrosis, disfunción hepática e hipertensión portal; lo que requiere frecuentemente un trasplante de hígado. Las causas comunes de la fibrosis hepática incluyen infección crónica de hepatitis C, alcoholismo y esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). La EHNA se caracteriza por presentar obesidad, diabetes mellitus de tipo 2, dislipidemia y, normalmente, resistencia a insulina. Los mecanismos celulares de la fibrosis hepática incluyen la liberación de factores solubles de células de *Kupfer* que activarán a las células estrelladas hepáticas (CEH) en mioblastos fibrogénicos. Las CEH activas también secretan citocinas para perpetuar el estado activo. Después de lesión persistente, las CEH activas producen grandes cantidades de proteínas de la matriz extracelular (PME). La degradación de las PME se evita por la acción de citocinas tales como las TIMP. Actualmente, no hay ninguna terapia convencional para la fibrosis hepática. Como tal, el planteamiento que se recomienda seguir es eliminar el agente causante, el que para la EHNA incluiría, la pérdida de peso y tratamientos específicos para el síndrome metabólico. (Véase por ejemplo, Battler, R. y Brenner, D.A., J. Clin. Invest. 115:209-218 (2005) y apéndice; Elsharkawy, A.M., Oakley, F y Mann, D.A., Apoptosis v.10, n.4, 927-939 (2005); y Rockey, D.C. Clinincal Gastroenterology and Hepatology 3:95-107 (2005)). Chen y col., (Artheroscler. Thromb. Vasc. Biol., 25, 482-486 (2004)) investigaron la fisiología de ratones con déficit de DGAT-1. Murry y col (Diabetes, 52, A300 (2003)) usaron inhibidores de DGAT-1 para modular niveles de glucosa en ratones. El documento WO 02/086085 describe anticuerpos que se unen a TIMP-1 para su uso en el tratamiento de diversas enfermedades. El documento US2004185559 describe moduladores de DGAT-1.

Existe una necesidad reconocida en la técnica para un tratamiento para la fibrosis hepática.

Sumario de la invención

La invención proporciona un oligonucleótido antisentido dirigido a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT-1) para su uso en la mejora, tratamiento o prevención de la fibrosis hepática. Otros aspectos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la divulgación

En el presente documento se desvelan compuestos, particularmente compuestos oligoméricos, especialmente ácido nucleico y oligómeros similares a ácido nucleico, que se dirigen a un ácido nucleico que codifica la diacilglicerol aciltransferasa 1 (en lo sucesivo en el presente documento "DGAT-1"). Los compuestos oligoméricos pueden ser oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de DGAT-1, particularmente DGAT-1 humana que modula la expresión de DGAT-1. El ácido nucleico que codifica la DGAT-1 puede tener una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente similar al N° de referencia de GenBank NM_012079.2, registrado el 1 de abril del 2000 (SEC ID N°: 4). El ácido nucleico puede ser la SEC ID N°: 4. Los compuestos oligoméricos comprenden al menos una parte de 8 nucleósidos, preferentemente una parte de 12 nucleósidos o al menos una parte de 15 nucleósidos, de las secuencias indicadas en las Tablas 3, 4 ó 6, o tienen al menos una identidad del 80% con segmentos diana validados, o las secuencias indicadas en o a continuación en las Tablas 3, 4 ó 6.

Se desvelan procedimientos para modular la actividad de la DGAT-1 en células o tejidos. La actividad de la DGAT-1 puede modularse mediante un compuesto que es específico para la DGAT-1. El modulador específico de la actividad de la DGAT-1 puede ser un compuesto antisentido que se dirige a un ácido nucleico que expresa el polipéptido DGAT-1. La actividad de la DGAT-1 se modula en células o tejidos poniendo en contacto dicha célula o tejido con dicho modulador. La actividad de la DGAT-1 se modula en un animal que necesita tal modulación administrando el compuesto a dicho animal. El modulador puede administrarse como una sal farmacéuticamente aceptable. El animal que lo necesita padece fibrosis hepática.

También se desvelan procedimientos para modular la expresión de la DGAT-1 en células o tejidos que comprenden poner en contacto las células con al menos un compuesto modulador de la DGAT-1 y analizar las células con respecto a indicadores de una disminución en la expresión de ARNm y/o proteínas de DGAT-1 midiendo directamente los niveles de ARNm y/o proteínas, y/o a indicadores de fibrosis hepática.

Adicionalmente se desvelan procedimientos para la prevención, mejora y/o tratamiento de la fibrosis hepática, deposición de colágeno aumentada en el hígado, niveles elevados de ARNm de α -SMA, niveles elevados de ARNm de TGF. β , hidroxilprolina elevada, esterificación de retinol reducida en el hígado, activación aumentada de células estrelladas hepáticas y otros indicadores y criterios de valoración de fibrosis hepática que comprende administrar, a un individuo que necesite tal intervención, un modulador de DGAT-1.

Adicionalmente se desvelan procedimientos para la prevención, mejora y/o tratamiento de la fibrosis hepática por

tratamiento de un agente causante, en los que el agente causante se trata modulando la expresión de la DGAT-1. El agente causante puede ser, niveles de triglicéridos elevados en plasma, niveles de triglicéridos elevados en hígado, esteatosis hepática, EHNA, EHGNA, obesidad, diabetes mellitus, dislipidemia, resistencia a insulina, síndrome metabólico, colesterolemia o combinaciones de los mismos.

- 5 Se desvelan procedimientos de uso de un modulador de la DGAT-1 para la preparación de un medicamento para la prevención, mejora o tratamiento de una enfermedad, especialmente una enfermedad asociada con, e incluyendo al menos un indicador de, fibrosis hepática.

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1 representa una serie de gráficos de la expresión de ARNm de DGAT-1 y DGAT-2 de tejido hepático de ratones en los grupos de control (alimentados con pienso normal), grupo placebo (dieta DMC y con solución salina) o grupo de tratamiento (dieta DMC y tratamiento con el ASO DGAT-1). Los resultados son a las 4 y 8 semanas.

La Figura 2 representa datos bioquímicos en plasma para los grupos de control, placebo y de tratamiento con DGAT-1.

15 La Figura 3 ilustra que el tratamiento con DGAT-1 no mejoró la esteatosis hepática, como se indica mediante los niveles de triglicéridos en hígado y tinción de Aceite Rojo para los grupos de control, placebo y de tratamiento con DGAT-1.

La Figura 4 es un gráfico que muestra cambios en la hidroxiprolina a las 4 y 8 semanas para los tres grupos.

20 La Figura 5 ilustra las diferencias a las 4 y 8 semanas en diversos factores de fibrosis hepática para los grupos de control, placebo y de tratamiento con DGAT-1.

La Figura 6 representa una serie de gráficos de la expresión de ARNm de DGAT-1 y de DGAT-2 de tejido hepático de ratones en los grupos de control (dieta con pienso normal), grupo placebo (dieta DMC y con solución salina) o grupo de tratamiento (dieta DMC y tratamiento con el ASO DGAT-2). Los resultados son a las 8 semanas.

25 La Figura 7 ilustra que el tratamiento con DGAT-2 mejoró la esteatosis hepática, como se indica mediante los niveles de triglicéridos en hígado y tinción de Aceite Rojo para los grupos de control, placebo y tratamiento con DGAT-2

La Figura 8 representa un gráfico que muestra cambios en la hidroxiprolina a las 4 y 8 semanas para los tres grupos.

30 La Figura 9 representa una serie de gráficos que ilustran el efecto del tratamiento con DGAT-2 sobre la expresión de ARNm activador de CEH. Estos resultados son a las 8 semanas.

Descripción detallada de la invención

35 La fibrosis hepática es un problema de salud principal que surge por lesión hepática crónica mediante una diversidad de factores etiológicos, incluyendo virus, alcoholismo y componentes del síndrome metabólico. (Elsharkawy, A.M. y Mann, D.A., Apoptosis, v.10, n.4 (2005). Las intervenciones terapéuticas para estas enfermedades o afecciones no son satisfactorias. (Véase, por ejemplo, Battler, R. y Brenner, D.A., J. Clin. Invest. 115:209-218 (2005) y apéndice; Elsharkaway, A.M., Oakley, F. y Mann, D.A., Apoptosis v.10, n.4, 927-939 (2005); y Rockey, D.C. Clinical Gastroenterology and Hepatology 3:95-107 (2005)). En el presente documento se proporcionan compuestos para la prevención, mejora y/o tratamiento de la fibrosis hepática.

40 Como se usa en el presente documento, el término "prevención" significa retrasar o impedir la aparición o desarrollo de una afección o enfermedad durante un período de tiempo de horas a días, preferentemente de semanas a meses. Como se usa en el presente documento, el término "mejora" significa una disminución de al menos un indicador de la gravedad de una afección o enfermedad. La gravedad de indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas conocidas por los expertos en la técnica. Como se usa en el presente documento, "tratamiento" significa administrar una composición de la invención para efectuar una modificación o mejoría de la enfermedad o afección.

50 En el presente documento se desvelan compuestos antisentido, incluyendo oligonucleótidos antisentido y otros compuestos antisentido para su uso en la modulación de la expresión de moléculas de ácido nucleico que codifican la DGAT-1. Esto se consigue proporcionando compuestos antisentido que se hibriden con una o más moléculas de ácido nucleico diana que codifican la DGAT-1. Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácido nucleico diana" y "molécula de ácido nucleico que codifica la DGAT-1" se han usado por conveniencia para incluir ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm o partes de los mismos), transcritos de ADN que codifican la DGAT-1 y también ADNc derivado de dicho ARN. En una realización preferida, el ácido nucleico diana es un ARNm que codifica la DGAT-1.

55 Ácidos nucleicos diana

"Dirigir" un compuesto antisentido a una molécula de ácido nucleico diana particular puede ser un proceso multi-etapa. El proceso normalmente comienza con la identificación de un ácido nucleico diana cuya expresión va a modularse. Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede ser un gen celular (o ARNm transcrito del gen) cuya expresión

se asocia con una patología o trastorno particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. Como se desvela en el presente documento, el ácido nucleico diana codifica la DGAT-1. El "sitio diana" se refiere al nucleósido lo más 5' sobre un ácido nucleico diana que se hibrida con un compuesto oligomérico. El sitio diana se calcula en base al diseño del compuesto oligomérico con respecto a la secuencia del ácido nucleico diana.

5 Variantes

También se conoce en la técnica que, a partir de la misma región genómica de ADN, pueden producirse transcritos de ARN alternativos. Estos transcritos alternativos se conocen generalmente como "variantes". Más específicamente, las "variantes de pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o de terminación y contienen secuencias intrónicas y exónicas. Las variantes pueden dar como resultado variantes de ARNm incluyendo, pero sin limitación, aquellas con puntos de unión de corte y empalme alternos, o codones de inicio y de terminación alternos. Las variantes en secuencias genómicas y de ARNm pueden dar como resultado enfermedades. Dentro del alcance de la presente invención se encuentran compuestos antisentido dirigidos contra dichas variantes.

15 Nombres, sinónimos, características de la diana.

En el presente documento se desvelan composiciones y procedimientos para modular la actividad de la DGAT-1 (diacilglicerol O-aciltransferasa, producto 1 génico relacionado con ACAT; ARGP1; Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa; DGAT; DGAT1; acil coenzima A:gen 1 relacionado con la colesterol aciltransferasa; diacilglicerol aciltransferasa; diglicérido aciltransferasa). En un ejemplo preferido estas composiciones y procedimientos modulan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de DGAT-1. La Tabla 1 indica los números de referencia de GenBank de secuencias correspondientes a moléculas de ácido nucleico que codifican la DGAT-1 (nt = nucleótido), la fecha de registro de la versión de la secuencia en el GenBank y la SEC ID N° correspondiente en la presente solicitud, cuando se asigna, cada una de las cuales se incorpora por referencia en el presente documento. Preferentemente, las composiciones y procedimientos modulan la expresión del polipéptido de DGAT-1 a partir de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que es sustancialmente similar a la SEC ID N°: 4. La expresión "sustancialmente similar" significa que una secuencia de interés tiene al menos una identidad del 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95% 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia dada. Sin proporcionar ninguna lista exhaustiva de porcentajes, el uso de al menos en este contexto significa que la similitud entre las secuencias incluye el número indicado anteriormente y todos los cálculos de identidad mayores que, incluyendo números enteros y parciales. Por ejemplo, al menos el 70% incluye todos los números enteros y todos los números decimales desde el 70% al 99,9%. Únicamente como ejemplo, una secuencia de interés y una secuencia dada, ambas con una longitud de 300 nucleósidos consecutivos, pero compartiendo una identidad solo entre 278 nucleósidos, deberían tener una identidad del 92,6%. Un experto habitual en la técnica determinará fácilmente estos porcentajes. La identidad en porcentaje entre dos secuencias puede determinarse mediante algoritmos de alineamiento convencionales tales como ClustalX, cuando las dos secuencias están en el mejor alineamiento de acuerdo con el algoritmo de alineamiento. Lo más preferentemente, las composiciones y procedimientos modulan la expresión del polipéptido de DGAT-1 a partir de una molécula de ácido nucleico que es la SEC ID N° 4.

Tabla 1

Dianas génicas			
Especie	N° GenBank	Fecha GenBank	SEC ID N°
Ser humano	BQ084235.1	4 de abril del 2002	1
Ser humano	AW391923.1_COMP	4 de febrero del 2000	2
Ser humano	NT_031818.5_TRUNC_226000_247000_COMP	1 de agosto del 2002 *	3
Ser humano	NM_012079.2	1 de abril del 2000	4
Ser humano	BI907285.1	16 de octubre del 2001	5
Ser humano	BQ225153.1	2 de mayo del 2002	6
Ratón	AF078752.1	12 de noviembre de 1998	7
Ratón	AI448840.1_COMP	26 de febrero de 1999	8
Ratón	NM_010046.2	19 de junio del 2003	9

Dianas génicas			
Especie	Nº GenBank	Fecha GenBank	SEC ID Nº
*sustituida por NT_037704			

Modulación

“Modulación” significa que la actividad de un compuesto está modificada. La modulación de la DGAT-1, por ejemplo, significa que la actividad de la DGAT-1 está modificada mediante la modulación directa del polipéptido de DGAT-1, mediante la modulación de su expresión a partir de ADN o ARNm, o una combinación de las mismas. La modulación directa de la DGAT-1 puede incluir moléculas pequeñas, polipéptidos, ácidos polinucleicos, anticuerpos u otros compuestos que interactúan con el polipéptido de DGAT-1 para modular (aumentar o disminuir) la actividad de este polipéptido. La modulación de la expresión de un ácido nucleico diana puede conseguirse mediante la modificación de cualquiera de las funciones del ácido nucleico (ADN o ARN). Por ejemplo, y con respecto a la modulación de la expresión de ARNm, modulación significa tanto un aumento (estimulación o inducción) como una disminución (inhibición o reducción) de la expresión del polipéptido de DGAT-1 a partir del ácido nucleico. Como otro ejemplo, la modulación de la expresión puede incluir perturbar la selección del sitio de corte y empalme del procesamiento del pre-ARNm. “Expresión” incluye todas las funciones mediante las cuales una información codificada por un gen se convierte en estructuras presentes y operativas en una célula. Estas estructuras incluyen los productos de transcripción y de traducción. La modulación de la expresión significa la perturbación de dichas funciones. Las funciones del ARN a modular pueden incluir funciones de translocación, que incluyen, pero sin limitación, translocación del ARN a un sitio de traducción de proteínas, translocación del ARN a sitios dentro de la célula que están alejados del sitio de la síntesis del ARN y la traducción de proteínas a partir del ARN. Las funciones de procesamiento del ARN que pueden modularse incluyen, pero sin limitación, el corte y empalme del ARN para producir una o más especies de ARN, protección del ARN, maduración en 3' del ARN y actividad catalítica o formación de complejos que impliquen al ARN que puedan acoplarse en o facilitarse por el ARN. La modulación de la expresión puede dar como resultado un nivel aumentado de una o más especies de ácido nucleico o un nivel disminuido de una o más especies de ácido nucleico, temporalmente o mediante un nivel en estado estacionario neto. Un resultado de tal interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de la DGAT-1. Por tanto, en una realización la modulación de la expresión puede significar, aumentar o disminuir los niveles de proteínas o de ARN diana. En otra realización la modulación de la expresión puede significar un aumento o una disminución de uno o más productos de corte y empalme de ARN, o un cambio en la proporción de dos o más productos de corte y empalme.

El efecto de los compuestos antisentido de la presente invención sobre la expresión de ácido nucleico diana puede someterse a ensayo en cualquiera de una diversidad de tipos celulares siempre que el ácido nucleico diana esté presente a niveles medibles. El efecto de los compuestos antisentido de la presente invención sobre la expresión de ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando, por ejemplo, PCR o análisis de transferencia de Northern. Las líneas celulares derivan de tipos de tejidos y células normales y de células asociadas con diversos trastornos (por ejemplo, trastornos hiperproliferativos). Pueden obtenerse líneas celulares derivadas de tejidos y especies múltiples de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y de otras fuentes de acceso público, bien conocidas por los expertos en la técnica. Las células primarias, o aquellas células que se aíslan de un animal y que no están sometidas a cultivo continuo, pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, o pueden obtenerse a partir de diversos proveedores comerciales. Adicionalmente, las células primarias incluyen las obtenidas a partir de sujetos humanos donantes en un entorno clínico (es decir, donantes de sangre, pacientes quirúrgicos). Las células primarias se preparan a partir de procedimientos conocidos en la técnica.

Ensayo de modulación de la DGAT-1

La modulación de la expresión de la DGAT-1 puede someterse ensayo de diversas maneras conocidas en la técnica. Los niveles de ARNm de la DGAT-1 pueden cuantificarse, por ejemplo, por análisis de transferencia de Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real. El Análisis de ARN puede realizarse sobre ARN celular total o sobre ARNm poli(A)+ mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se explican procedimientos para el aislamiento de ARN, por ejemplo, en Ausubel, F.M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 1, páginas 4.1.1-4.2.9 y 4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

El análisis de transferencia de Northern es rutinario en la técnica y se explica, por ejemplo, en Ausubel, F.M. y col., Current Protocols in Molecular Biology, volumen 1, páginas 4.2.1-4.2.9, John Wiley & Sons, Inc., 1996. La (PCR) cuantitativa en tiempo real puede realizarse convenientemente usando el sistema de detección de secuencia disponible en el mercado de ABI PRISM™ 7700, disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El procedimiento de análisis de modulación de los niveles de ARN no es una limitación de la presente invención.

Los niveles de una proteína codificada por la DGAT-1 pueden cuantificarse de diversas maneras bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia de Western (inmunotransferencia), ELISA o separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Pueden identificarse anticuerpos dirigidos a una proteína

codificada por la DGAT-1 y obtenerse a partir de diversas fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, MI) o pueden prepararse mediante procedimientos de generación de anticuerpos convencionales. Se explican procedimientos para la preparación de antisuero policlonal, por ejemplo, en Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 2, páginas 11.12.1-11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997. La preparación de anticuerpos monoclonales se explica, por ejemplo, en Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 2, páginas 11.4.1-11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997.

Los procedimientos de inmunoprecipitación son convencionales en la técnica y pueden encontrarse, por ejemplo, en Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 2, páginas 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998. El análisis de transferencia de Western (inmunotransferencia) es convencional en la técnica y puede encontrarse, por ejemplo, en Ausubel, F.M. y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen 2, páginas 10.8.1-10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1997.

Segmentos diana activos

Las localizaciones sobre el ácido nucleico diana definidas por tener uno o más compuestos antisentido activos dirigidos a ello, se denominan "segmentos diana activos". Cuando un segmento diana activo está definido por compuestos antisentido múltiples, los compuestos están separados preferentemente por no más de aproximadamente 10 nucleótidos sobre la secuencia diana, más preferentemente no más de aproximadamente 5 nucleótidos sobre la secuencia diana, incluso más preferentemente los compuestos son contiguos, más preferentemente los compuestos se solapan. Dentro de un segmento diana activo, puede haber una variación sustancial en cuanto a la actividad (por ejemplo, definida por la inhibición en porcentaje) de los compuestos antisentido. Los compuestos antisentido activos son aquellos que modulan la expresión de su ARN diana. Los compuestos antisentido activos inhiben la expresión de su ARN diana al menos un 45%, preferentemente al menos un 50%, más preferentemente al menos un 70%, más preferentemente incluso al menos un 80%, más preferentemente incluso al menos un 90% y más preferentemente al menos un 95%. Como se ha indicado anteriormente, al menos se usa para incluir el número indicado anteriormente y todos los números enteros y decimales mayores que. En una realización más preferida, el nivel de inhibición necesario para definir un compuesto antisentido activo se define basándose en los resultados de la selección usada para definir los segmentos diana activos.

Hibridación

Como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el emparejamiento de cadenas complementarias de compuestos antisentido con su secuencia diana. Aunque sin limitarse a ningún mecanismo particular, el mecanismo de emparejamiento más común requiere puentes de hidrógeno, que pueden ser de Watson-Crick, de Hoogsteen o puentes de hidrógeno de Hoogsteen inversos, entre bases nucleosídicas o nucleotídicas (nucleobases) complementarias. Por ejemplo, la base natural adenina es complementaria a las nucleobases naturales timidina y uracilo que se emparejan mediante la formación de puentes de hidrógeno. La base natural guanina es complementaria a la base natural 5-metil citosina y a la base artificial conocida como G-clamp. La hibridación puede producirse en diversas circunstancias.

Un compuesto antisentido puede hibridarse específicamente cuando existe un grado de complementariedad suficiente para impedir la unión no específica del compuesto antisentido con las secuencias de ácido nucleico no diana en condiciones en las que se desea unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico y en condiciones como en los casos en los que se realizan ensayos *in vitro*.

Como se usa en el presente documento, "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que un compuesto antisentido se hibridará con su secuencia diana, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias y las "condiciones rigurosas" en las que los compuestos antisentido se hibridan con una secuencia diana vendrán determinadas por la naturaleza y la composición de los compuestos antisentido y por los ensayos de investigación que se estén realizando.

Complementariedad

"Complementariedad", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de emparejamiento exacto entre dos nucleobases sobre dos cadenas del compuesto oligomérico o un compuesto antisentido con su ácido nucleico diana. Por ejemplo, si en una posición determinada de un compuesto antisentido, una nucleobase es capaz de formar puentes de hidrógeno con una nucleobase en una posición determinada de un ácido nucleico diana, entonces la posición del puente de hidrógeno entre el oligonucleótido y el ácido nucleico diana se considera que es una posición complementaria. El compuesto antisentido y el ADN o ARN adicional son complementarios entre sí cuando en cada molécula un número suficiente de posiciones complementarias está ocupado por nucleobases que pueden unirse entre sí por puentes de hidrógeno. Por tanto, "específicamente hibridable" y "complementariedad" son expresiones que se usan para indicar un grado suficiente de emparejamiento o complementariedad exacta sobre un número suficiente de nucleobases de tal manera que entre el compuesto antisentido y un ácido nucleico

diana se produce la unión estable y específica.

Identidad

Los compuestos antisentido, o una parte de los mismos, pueden tener un porcentaje de identidad definido con respecto a una SEC ID N^o, o un compuesto que tiene un número de Isis específico. Como se usa en el presente documento, una secuencia es idéntica a la secuencia desvelada en el presente documento si tiene la misma capacidad de emparejamiento de nucleobases. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en las secuencias desveladas de la presente invención se considera idéntico ya que los dos se emparejan con adenina. De manera similar, una base heterocíclica modificada G-clamp se consideraría idéntica a una citosina o a una 5-Me citosina en las secuencias de la presente solicitud ya que se emparejan con una guanina. Esta identidad puede ser sobre la longitud completa del compuesto oligomérico, o sobre una parte del compuesto antisentido (por ejemplo, para determinar la identidad en porcentaje del compuesto oligomérico con la SEC ID N^o, pueden compararse de 1-20 nucleobases de un oligómero de 27 unidades con un oligómero de 20 unidades). Los expertos en la técnica saben que un compuesto antisentido no necesita tener una secuencia idéntica con la descrita en el presente documento para funcionar de manera similar con el compuesto antisentido descrito en el presente documento. Versiones más cortas del compuesto antisentido indicado en el presente documento, o versiones no idénticas del compuesto antisentido indicado en el presente documento se encuentran dentro del ámbito de la invención. Son versiones no idénticas aquellas en las que cada base no tiene la misma actividad de emparejamiento que la de los compuestos antisentido desvelados en el presente documento. Las bases no tienen la misma actividad de emparejamiento siendo más pequeñas o teniendo al menos un sitio básico. Como alternativa, una versión no idéntica puede incluir al menos una base sustituida con una base diferente con una actividad de emparejamiento diferente (por ejemplo, G puede sustituirse por C, A o T). En una realización preferida, los compuestos antisentido tendrán no más de tres emparejamientos erróneos con una secuencia de ácido nucleico que codifica la DGAT-1. La expresión "no más de tres emparejamientos erróneos" incluye 0 emparejamientos erróneos, 1 emparejamiento erróneo, 2 emparejamientos erróneos y 3 emparejamientos erróneos. El porcentaje de identidad se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen idéntico emparejamiento de bases correspondiente con la SEC ID N^o o compuesto antisentido con el cual se está comparando. Las bases no idénticas pueden ser adyacentes entre sí, pueden estar dispersas a lo largo del oligonucleótido, o ambas cosas.

Por ejemplo, un oligómero de 16 unidades que tiene la misma secuencia que las nucleobases 2-17 de un oligómero de 20 unidades tiene una identidad del 80% con el oligómero de 20 unidades. Como alternativa, un oligómero de 20 unidades que contiene cuatro nucleobases no idénticas al oligómero de 20 unidades tiene también una identidad de 80% con el oligómero de 20 unidades. Un oligómero de 14 unidades que tiene la misma secuencia que las nucleobases 1-14 de un oligómero de 18 unidades tiene una identidad del 78% con el oligómero 18 unidades. Dichos cálculos se encuentran dentro de la competencia de los expertos en la técnica, y adicionalmente, aquellos expertos en la técnica reconocen fácilmente que los cálculos del porcentaje de identidad pueden equipararse con porcentajes numéricos no enteros.

El porcentaje de identidad se basa en el porcentaje de nucleobases en la secuencia original presente en una parte de la secuencia modificada. Por lo tanto, un compuesto antisentido de 30 nucleobases que comprende la secuencia completa del complemento de un segmento diana activo de 20 nucleobases debe tener una parte de identidad del 100% con el complemento del segmento diana activo de 20 nucleobases, mientras que adicionalmente comprende una parte adicional de 10 nucleobases. En el contexto de la invención, el complemento de un segmento diana activo puede constituir una sola parte. En una realización preferida, los oligonucleótidos de la presente invención tienen al menos aproximadamente una identidad del 80%, más preferentemente al menos aproximadamente del 85%, incluso más preferentemente al menos aproximadamente del 90%, más preferentemente al menos una identidad del 95% con al menos una parte del complemento de los segmentos diana activos presentados en el presente documento.

Los expertos en la técnica saben bien que es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido y/o introducir bases con emparejamiento erróneo sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf y col (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992, se sometió a ensayo una serie de ASO (oligonucleótidos antisentido) de 13-25 nucleobases de longitud para ensayar su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de inyección de ovocitos. Los ASO de 25 nucleobases de longitud con 8 u 11 bases de emparejamiento erróneo cerca de los extremos de los ASO pudieron dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque a un menor grado que los ASO que no contenían emparejamientos erróneos. De manera similar, se consiguió escisión específica diana usando un ASO de 18 nucleobases, que incluía aquellos con 1 ó 3 emparejamientos erróneos. Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) ensayaron una serie de ASO de 14 nucleobases en tándem, y ASOs de 28 y 42 nucleobases comprendidos por la secuencia de dos o tres de los ASOs en tándem, respectivamente, para detectar su capacidad de detener la traducción de la DHFR humana en un ensayo con reticulocitos en conejos. En solitario, cada uno de los tres ASO de 14 nucleobases pudieron inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los ASO de 28 y 42 nucleobases.

Compuestos terapéuticos

Los compuestos antisentido pueden usarse para modular la expresión de la DGAT-1 en un animal, tal como un ser humano. En un ejemplo no limitante, los procedimientos comprenden la etapa de administrar a dicho animal que

necesita la terapia, para una enfermedad o afección asociada con la DGAT-1, una cantidad eficaz de un compuesto antisentido que inhiba la expresión de la DGAT-1. Una enfermedad o afección asociada con la DGAT-1 incluye, pero sin limitación, fibrosis hepática. En un ejemplo, los compuestos antisentido de la presente invención inhiben eficazmente los niveles o la función del ARN de la DGAT-1. Dado que la reducción en cuanto a los niveles del ARNm de la DGAT-1 también puede conducir a la modificación de los productos de expresión de la proteína DGAT-1, dichas modificaciones resultantes también puede medirse. Los compuestos antisentido de la presente invención que inhiben eficazmente el nivel o la función del ARN de la DGAT-1 o los productos de expresión de la proteína se consideran como un compuesto antisentido activo. En una realización, los compuestos antisentido inhiben la expresión de la DGAT-1 produciendo una reducción del ARN en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, al menos un 99% o al menos un 100%.

Por ejemplo, la reducción de la expresión de la DGAT-1 puede medirse en un fluido, tejido u órgano corporal del animal. Los procedimientos para obtener muestras para análisis, tales como fluidos corporales (por ejemplo, sangre), tejidos (por ejemplo, biopsias) u órganos, y los procedimientos de preparación de las muestras para permitir el análisis son bien conocidos por los expertos en la materia. Los procedimientos para el análisis de los niveles de ARN y proteínas se describen anteriormente y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los efectos del tratamiento pueden valorarse midiendo biomarcadores asociados con la expresión de la DGAT-1 en los fluidos, tejidos u órganos mencionados anteriormente, extraídos de un animal que se ha puesto en contacto con uno o más compuestos de la invención, mediante procedimientos clínicos rutinarios conocidos en la técnica. Estos biomarcadores incluyen, pero sin limitación: transaminasas hepáticas, bilirrubina, albúmina, nitrógeno ureico en sangre, creatina y otros marcadores de función renal y hepática; interleucinas, factores de necrosis tumoral, moléculas de adhesión intracelular, proteína C reactiva, quimiocinas, citocinas y otros marcadores de fibrosis hepática, obesidad, esteatosis hepática, EHNA, EHGNA, diabetes mellitus, dislipidemia, resistencia a insulina, síndrome metabólico y colesterolemia.

Los compuestos antisentido de la presente invención pueden utilizarse en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y diluyentes aceptables son bien conocidos por los expertos en la técnica. La selección de un diluyente o un transportador se basa en diversos factores, incluyendo, pero sin limitación, la solubilidad del compuesto y la vía de administración. Dichas consideraciones son bien conocidas por los expertos en la técnica. En un aspecto, los compuestos de la presente invención inhiben la expresión de la DGAT-1. Los compuestos de la invención también pueden usarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con la expresión de la DGAT-1.

También se contemplan procedimientos mediante los cuales los fluidos, órganos o tejidos corporales se ponen en contacto con una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos antisentido o composiciones de la presente invención. Los fluidos, órganos o tejidos corporales pueden ponerse en contacto con uno o más de los compuestos de la invención dando como resultado la modulación de la expresión de la DGAT-1 en las células de los fluidos, órganos o tejidos corporales.

Por tanto, en el presente documento se proporciona el uso de un modulador de la DGAT-1, preferentemente un compuesto antisentido mono- o bicatenario preferentemente aislado dirigido a la DGAT-1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediante el procedimiento descrito anteriormente. En una realización más preferida, el compuesto antisentido es un compuesto antisentido monocatenario. En una realización más preferida, el compuesto es un compuesto antisentido quimérico que comprende un intervalo de longitud de nucleósidos consecutivos, siendo el extremo superior del intervalo de 50 nucleósidos y siendo el extremo inferior del intervalo de 12 nucleósidos, comprendiendo adicionalmente una o más de una modificación de nucleobases, una modificación de enlace internucleosídico, una modificación glucídica de alta afinidad o una combinación de las mismas y adicionalmente comprendiendo no más de tres emparejamientos erróneos con una secuencia de ácido nucleico diana que codifica la DGAT-1.

Kits, reactivos de investigación y diagnóstico

Los compuestos antisentido de la presente invención pueden utilizarse para el diagnóstico y como reactivos y kits de investigación. Adicionalmente, los compuestos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica con especificidad, se usan a menudo por los expertos habituales en la técnica para aclarar la función de genes particulares o para diferenciar entre funciones de diversos miembros de una ruta biológica.

Para su uso en kits y diagnósticos, los compuestos antisentido de la presente invención, tanto en solitario o en combinación con otros compuestos o agentes terapéuticos, pueden usarse como herramientas en análisis diferenciales y/o combinatorios para aclarar modelos de expresión de una parte o de todo el complemento de genes expresados dentro de las células y tejidos. Los procedimientos de los análisis de expresión de genes son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Compuestos

La expresión “compuesto oligomérico” se refiere a una estructura polimérica capaz de hibridarse con una región de una molécula de ácido nucleico. Generalmente, los compuestos oligoméricos comprenden una pluralidad de subunidades monoméricas unidas entre sí mediante grupos de enlace internucleosídico y/o miméticos de enlace internucleosídico. Cada una de las subunidades monoméricas comprende un glúcido, un glúcido abásico, un glúcido modificado, o un mimético de glúcido, y a excepción del glúcido abásico incluye una nucleobase, una nucleobase modificada o un mimético de nucleobase. Las subunidades monoméricas preferidas comprenden nucleósidos y nucleósidos modificados.

Un “compuesto antisentido” o “compuesto oligomérico antisentido” se refiere a un compuesto oligomérico que es al menos parcialmente complementario a la región de una molécula de ácido nucleico diana a la cual se hibrida y que modula (aumenta o disminuye) su expresión. Esta expresión incluye oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, compuestos oligoméricos antisentido y combinaciones químicas de estos. Por consiguiente, cuando se dice que todos los compuestos antisentido son compuestos oligoméricos, no todos los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. Un “oligonucleótido antisentido” es un compuesto antisentido que es un oligómero basado en ácido nucleico. Un oligonucleótido antisentido puede, en algunos casos, incluir una o más modificaciones químicas con respecto al glúcido, base y/o enlaces internucleosídicos. Como ejemplos no limitantes de compuestos antisentido se incluyen cebadores, sondas, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos de secuencia guía externa (SGE), empalmadores alternativos y ARNip. Como tal, estos compuestos pueden introducirse en forma de cadena sencilla, cadena doble, circular, ramificada u horquillas y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Los compuestos bicatenarios antisentido pueden ser dos cadenas hibridadas para formar compuestos bicatenarios o una cadena sencilla con suficiente auto-complementariedad para permitir la hibridación y formación de un compuesto parcial o completamente bicatenario. Los compuestos de la presente invención no son auto-catalíticos. Como se usa en el presente documento, “auto-catalítico” significa un compuesto que tiene la capacidad de promover la escisión del ARN diana en ausencia de factores accesorios, por ejemplo proteínas.

En una realización, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido monocatenario. En algunas realizaciones de la invención el compuesto antisentido contiene modificaciones químicas. En una realización preferida, el compuesto antisentido es un oligonucleótido químérico, monocatenario, en el que las modificaciones de glúcidos, bases y enlaces internucleosídicos se seleccionan independientemente. En una realización más preferida el compuesto es un compuesto antisentido químérico que comprende un intervalo de longitud de nucleósidos consecutivos, en el que el extremo superior del intervalo es de 50 nucleósidos y en el que el extremo inferior del intervalo es de 12 nucleósidos, comprendiendo adicionalmente una o más de una modificación de nucleobases, una modificación de enlace internucleosídico, una modificación glucídica de alta afinidad o una combinación de los mismos y comprendiendo adicionalmente no más de tres emparejamientos erróneos con la secuencia de ácido nucleico diana (SEC ID N°: 4) que codifica la DGAT-1.

Los compuestos antisentido del presente documento pueden comprender un intervalo de longitud de nucleósidos consecutivos en el que el extremo superior del intervalo es de 50 nucleósidos y en el que el extremo inferior del intervalo es 12 nucleósidos. Más preferentemente, el extremo superior del intervalo es de 35 nucleósidos y el extremo inferior del intervalo es de 14 nucleósidos. Más preferentemente aún, el extremo superior del intervalo es de 24 nucleósidos y en el que el extremo inferior del intervalo es de 17 nucleósidos. Más preferentemente el compuesto antisentido tiene 20 nucleósidos consecutivos. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que el extremo superior del intervalo, como se desvela en el presente documento, comprende 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 nucleósidos consecutivos y el extremo inferior del intervalo comprende 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 nucleósidos consecutivos.

Se considera que los compuestos antisentido, como se describe en el presente documento, que comprenden un tramo de al menos 8, preferentemente de al menos 12, más preferentemente de al menos 15 nucleósidos consecutivos, seleccionado del interior de las regiones diana activas, también son compuestos antisentido adecuados.

En los compuestos antisentido de la presente invención pueden realizarse modificaciones y pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los extremos, posiciones de nucleobases seleccionadas, posiciones glucídicas o a uno de los enlaces internucleosídicos. Las posibles modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificaciones glucídicas de alta afinidad 2'-fluoro (2'-F), 2'-OMetilo (2'-OMe), 2'-O-(2-metoxietilo) (2'-MOE), terminaciones abásicas inversas, deoxinucleobases y análogos de nucleobases bicíclicas tales como ácidos nucleicos bloqueados (ANB) y ácidos nucleicos con puentes de etileno (ANE).

En una realización de la invención, los compuestos antisentido bicatenarios incluyen ARN interferente pequeño (ARNip). Como se usa en el presente documento, el término “ARNip” se define como un compuesto bicatenario que tiene una primera cadena y una segunda cadena, teniendo cada cadena una parte central y dos partes terminales independientes. La parte central de la primera cadena es complementaria a la parte central de la segunda cadena, permitiendo la hibridación de las cadenas. Opcionalmente, las partes terminales son independientemente

complementarias con la parte terminal correspondiente de la cadena complementaria. Los extremos de las cadenas pueden modificarse añadiendo uno o más nucleósidos naturales o modificados para formar un saliente.

5 Cada cadena del dúplex de ARNip puede encontrarse dentro de los intervalos de longitud descritos anteriormente. En una realización preferida, cada cadena del dúplex de ARNip es de aproximadamente 17 a aproximadamente 25 nucleósidos. Las dos cadenas pueden ser completamente complementarias (es decir, formar un compuesto de extremos romos), o pueden incluir un saliente en 5' o 3' en una o ambas cadenas. Pueden fabricarse compuestos bicatenarios incluyendo modificaciones químicas, como se describe en el presente documento.

Modificaciones químicas

10 Como se conoce en la técnica, y como se ha indicado en el presente documento, el término "nucleósido" se usa para referirse a una combinación de glúcido-base de una unidad monomérica de ácido nucleico. La parte base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que adicionalmente incluyen un grupo fosfato unido covalentemente a la parte glucídica del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un glúcido de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse al resto 2', 3' ó 5' hidroxilo del glúcido. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Dentro de los oligonucleótidos, a los grupos fosfato se les denominan normalmente formadores de la estructura internucleósido del oligonucleótido. El enlace o estructura normal del ARN o ADN es un enlace fosfodiéster en dirección 3' a 5'. Frecuentemente, se prefiere incluir modificaciones químicas en los oligonucleótidos para modificar su actividad. Las modificaciones químicas pueden modificar la actividad del oligonucleótido, aumentando, por ejemplo, la afinidad de un oligonucleótido antisentido por su ARN diana, la resistencia a nucleasas, y/o modificando las propiedades farmacocinéticas del oligonucleótido. El uso de modificaciones químicas para aumentar la afinidad de un oligonucleótido por su diana puede permitir el uso de compuestos oligonucleotídicos más pequeños.

25 El término "nucleobase" o la expresión "resto de base heterocíclica" como se usa en el presente documento, se refiere a la parte de la base heterocíclica de un oligonucleósido. En general, una nucleobase es cualquier grupo que contiene uno o más átomos o grupos de átomos capaces de formar enlaces de hidrógeno con una base de otro ácido nucleico. Además de nucleobases "no modificadas" o "naturales", tales como las nucleobases purínicas, adenina (A) y guanina (G) y las nucleobases pirimidínicas, timidina (T), citosina (C) y uracilo (U), muchas nucleobases modificadas o miméticas de nucleobases, conocidos por los expertos en la técnica, son factibles para la presente invención. Las expresiones nucleobases modificadas y miméticas de nucleobases pueden solaparse pero generalmente una nucleobase modificada se refiere a una nucleobase que es bastante similar, en cuanto a la estructura, a la nucleobase parental, tal como, por ejemplo, una 7-deaza purina o una 5-metil citosina, mientras que un mimético de nucleobase incluiría estructuras más complicadas, tales como, por ejemplo, un mimético de nucleobase de fenoxazina tricíclica. Los expertos en la técnica conocen bien procedimientos para fabricar las nucleobases modificadas indicadas anteriormente.

40 Los compuestos antisentido de la presente invención también pueden contener uno o más nucleósidos que tienen restos glucídicos modificados. El anillo furanosilo del glúcido de un nucleósido puede modificarse de diversas maneras incluyendo, pero sin limitación, la adición de un grupo sustituyente, la formación de puentes de dos átomos de anillo no geminales para formar un ácido nucleico bicíclico (ANB) y la sustitución de oxígeno del anillo en la posición 4 por un átomo o grupo, tal como, S-, N(R) o C(R₁)(R₂). Se conocen bien restos glucídicos modificados y pueden usarse para modificar, típicamente aumentar, la afinidad del compuesto antisentido por su diana y/o aumentar la resistencia a nucleasas. Un listado representativo de glúcidos modificados preferidos incluye, pero sin limitación, glúcidos bicíclicos modificados (ANB), incluyendo ANL y ANE (puente en 4'-(CH₂)₂-O-2'); y glúcidos sustituidos, especialmente glúcidos 2'-sustituidos que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH₂ o un 2'-O(CH₂)₂-OCH₃. Los glúcidos también pueden reemplazarse, entre otros, con grupos miméticos glucídicos. Los expertos en la técnica conocen bien procedimientos para preparar glúcidos modificados.

50 Los grupos de enlace internucleosídico unen entre sí nucleósidos o, de otra manera, unidades monoméricas modificadas, formando por tanto un compuesto antisentido. Las dos clases principales de grupos de enlace internucleosídico se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces internucleosídicos representativos que contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, fosfosdiésteres, fosfostríésteres, metil fosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos. Los grupos de enlace internucleosídico representativos que no contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, metilmetilimino (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), tiodiéster (-O-C(O)-S-), tionocarbamato (-O-C(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)₂-O-) y N,N'-dimetilhidrazina (-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃-). Los compuestos antisentido que tienen grupos de enlace internucleosídico que no tienen fósforo se denominan oligonucleósidos. Los enlaces internucleosídicos modificados, en comparación con los enlaces fosfodiéster naturales, pueden usarse para modificar, típicamente aumentar, la resistencia a nucleasas del compuesto antisentido. Los enlaces internucleosídicos que tienen un átomo quiral pueden prepararse racémicos, quirales o mezclados. Los enlaces internucleosídicos quirales representativos incluyen, pero sin limitación, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los expertos en la técnica conocen bien procedimientos para preparar enlaces que contienen fósforo y enlaces que no contienen fósforo.

Como se usa en el presente documento, el término "mimético" se refiere a grupos que están sustituidos por un glúcido, una nucleobase y/o un enlace internucleosídico. Generalmente, en lugar del glúcido o combinación de enlace internucleosídico-glúcido, se usa un mimético, y la nucleobase se mantiene para la hibridación con una diana seleccionada. Los ejemplos representativos de un mimético glúcido incluyen, pero sin limitación, ciclohexenil o morfolino. Los ejemplos representativos de un mimético para una combinación de enlace internucleosídico-glúcido incluyen, pero sin limitación, ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y grupos morfolino unidos mediante enlaces aquirales no cargados. En algunos casos, en lugar de la nucleobase se usa un mimético. Los miméticos de nucleobase representativos se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, análogos tricíclicos de fenoxazina y bases universales (Berger y col., Nuc Acid Res. 2000, 28: 2911-14). Los expertos en la técnica conocen bien procedimientos de síntesis de miméticos de glúcidos, nucleósidos y nucleobases.

Como se usa en el presente documento el término "nucleósido" incluye, nucleósidos, nucleósidos abásicos, nucleósidos modificados y nucleósidos que tienen bases miméticas y/o grupos glucídicos.

En el contexto de la presente invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un compuesto oligomérico que es un oligómero o polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN). Este término incluye oligonucleótidos compuestos por nucleobases de origen natural y no natural, glúcidos y enlaces internucleosídicos covalentes, posiblemente incluyendo también conjugados de ácido no nucleico.

La presente invención proporciona compuestos que tienen grupos fósforo reactivos útiles para la formación de enlaces internucleosídicos que incluyen por ejemplo enlaces internucleosídicos fosfosdiéster y fosforotioato. Los procedimientos para la preparación y/o purificación de precursores o compuestos antisentido de la presente invención no son una limitación de las composiciones o procedimientos de la invención. Los procedimientos para la síntesis y purificación de ADN, ARN y los compuestos antisentido de la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento la expresión "compuesto quimérico antisentido" se refiere a un compuesto antisentido que tiene al menos un glúcido, nucleobase y/o enlace internucleosídico que está modificado diferencialmente en comparación con los otros glúcidos, nucleobases y enlaces internucleosídicos dentro del mismo compuesto oligomérico. Los restantes glúcidos, nucleobases y enlaces internucleosídicos pueden, o no, modificarse independientemente. En general, un compuesto oligomérico quimérico tendrá nucleósidos modificados que pueden estar en posiciones aisladas o agrupadas entre sí en regiones que definirán un motivo particular. Un compuesto oligomérico quimérico de la presente invención puede comprender cualquier combinación de modificaciones y o grupos miméticos.

Los compuestos oligoméricos quiméricos típicamente contienen al menos una región modificada para conferir resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, captación celular aumentada y/o afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico diana. Una región adicional del compuesto oligomérico puede servir como un sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. Como ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión del ADN diana, por lo tanto potenciando enormemente la eficacia de la inhibición de la expresión génica. Por consiguiente, cuando se usan quimeras, a menudo pueden obtenerse resultados comparables con compuestos oligoméricos más pequeños, en comparación, por ejemplo, con desoxioligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. La escisión del ADN diana puede detectarse rutinariamente mediante electroforesis en gel, y si fuera necesario, mediante técnicas de hibridación de ácido nucleico asociadas conocidas en la técnica.

Adicionalmente, pueden describirse determinados compuestos oligoméricos quiméricos, así como no quiméricos, por tener un motivo particular. Como se usa en la presente invención, el término "motivo" se refiere a la orientación de restos glucídicos modificados y/o grupos miméticos glucídicos en un compuesto antisentido con respecto a nucleósidos similares o modificados o no modificados diferencialmente. Como se usa en la presente invención, las expresiones "glúcidos", "restos glucídicos" y "grupos miméticos glucídicos" se usan de manera indistinta. Tales motivos incluyen, pero sin limitación, motivos con huecos, motivos alternantes, motivos completamente modificados, motivos hemiméricos, motivos en bloque y motivos posicionalmente modificados. La secuencia y la estructura de las nucleobases y tipos de enlaces internucleosídicos no es un factor en la determinación del motivo de un compuesto antisentido.

Como se usa en la presente invención la expresión "motivo con hueco" se refiere a un compuesto antisentido que comprende una secuencia contigua de nucleósidos que está dividida en 3 regiones, una región interna (hueco) flanqueada por dos regiones externas (alas). Las regiones se diferencian entre sí por tener al menos grupos glucídicos diferencialmente modificados que comprenden los nucleósidos. En algunas realizaciones, cada región modificada se modifica uniformemente (por ejemplo los grupos glucídicos modificados en una región determinada son idénticos); sin embargo, a las regiones pueden aplicarse otros motivos. Por ejemplo, las alas en un oligómero con huecos podrían tener un motivo alternante. Los nucleósidos localizados en el hueco de un compuesto antisentido con huecos tienen restos glucídicos que son diferentes a los de los restos glucídicos modificados en cada una de las alas. Como ejemplo únicamente, y no como limitación, un compuesto antisentido que tiene una longitud de 20 nucleobases comprende cinco modificaciones 2'-O-(2-metoxietilo) glucídicas consecutivas en el

extremo 5' del compuesto, seguido por diez 2'-desoxi glúcidos consecutivos a los que les siguen cinco modificaciones 2'-O-(2-metoxietilo) glucídicas consecutivas en el extremo 3' del compuesto. Este motivo representa un hueco 2'-desoxi flanqueado por alas 2'-O-(2-metoxietilo). En un ejemplo adicional, no limitativo, un compuesto antisentido de 14 nucleobases de longitud comprende tres modificaciones 2'-O-(2-metoxietilo) glucídicas consecutivas en el extremo 5' del compuesto, seguido de ocho 2'-desoxi glúcidos consecutivos a los que les siguen tres modificaciones 2'-O-(2-metoxietilo) glucídicas consecutivas en el extremo 3' del compuesto. Este motivo también representa un hueco 2'-desoxi flanqueado por alas 2'-O-(2-metoxietilo).

Como se usa en la presente invención, la expresión "motivo alternante" se refiere a un compuesto antisentido que comprende una secuencia de nucleósidos contigua que comprende dos nucleósidos glucídicos modificados diferencialmente que se alternan esencialmente a lo largo de toda la secuencia del compuesto antisentido, o esencialmente a lo largo de la secuencia completa de una región de un compuesto antisentido.

Como se usa en la presente invención, la expresión "motivo completamente modificado" se refiere a un compuesto antisentido que comprende una secuencia de nucleósidos contigua en la que esencialmente cada nucleósido es un nucleósido modificado con glúcido que tiene una modificación uniforme.

Como se usa en la presente invención, la expresión "motivo hemimérico" se refiere a una secuencia de nucleósidos que tiene restos glucídicos uniformes (glúcidos idénticos, modificados o no modificados) y en la que el extremo 5' o el extremo 3' tiene una secuencia de 2 a 12 nucleósidos que son nucleósidos modificados con glúcido que son diferentes de los otros nucleósidos en el compuesto antisentido hemimérico modificado.

Como se usa en la presente invención, la expresión "motivo en bloque" se refiere a una secuencia de nucleósidos que tiene glúcidos uniformes (glúcidos idénticos, modificados o no modificados) que está internamente interrumpida por un bloque de nucleósidos modificados con glúcido que están uniformemente modificados y en el que la modificación es diferente de la de otros nucleósidos. Los expertos en la técnica conocen bien procedimientos para preparar compuestos oligonucleotídicos quiméricos.

Como se usa en la presente invención, la expresión "motivo posicionalmente modificado" comprende los motivos restantes. Los expertos en la técnica conocen bien procedimientos para preparar compuestos oligonucleotídicos posicionalmente modificados.

Los compuestos descritos en el presente documento contienen uno o más centros asimétricos y por tanto dan lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras configuraciones estereoisoméricas que pueden definirse, en cuanto a estereoquímica absoluta, como (R) o (S), α o β , o como (D) o (L) tal como para aminoácidos y otros. La presente invención pretende incluir todos estos isómeros posibles, así como sus formas racémicas y ópticamente puras.

En un aspecto de la presente invención, los compuestos antisentido se modifican mediante unión covalente de uno o más grupos conjugados. Los grupos conjugados pueden unirse mediante uniones reversibles o irreversibles. Los grupos conjugados pueden unirse directamente a compuestos antisentido o mediante el uso de un engarce. Los engarces pueden ser engarces mono o bifuncionales. Dichos procedimientos de unión y engarces son bien conocidos por los expertos en la técnica. En general, los grupos conjugados se unen a los compuestos antisentido para modificar una o más propiedades. Dichas consideraciones son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Síntesis de oligómeros

La oligomerización de nucleósidos modificados y no modificados puede realizarse de acuerdo con procedimientos bibliográficos para ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Human Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait y col., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo y col., (2001), Tetrahedron 57, 5707-5713).

Los compuestos antisentido de la presente invención pueden fabricarse de manera conveniente y rutinaria mediante técnicas bien conocidas de síntesis de fase sólida. Los equipos para realizar dicha síntesis los comercializan diversos proveedores, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA). Para dicha síntesis puede emplearse, de manera adicional o alternativa, cualquier otro medio conocido en la técnica. Se conoce bien el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. La invención no se limita al procedimiento de síntesis de compuestos antisentido.

Purificación y análisis de oligómeros

Los procedimientos de purificación y análisis de oligonucleótidos son conocidos por los expertos en la técnica. Los procedimientos de análisis incluyen electroforesis capilar (EC) y espectroscopia de masas por electropulverización. Dichos procedimientos de síntesis y análisis pueden realizarse en placas multipocillo. El procedimiento de la invención no está limitado por el procedimiento de purificación de oligómeros.

Sales, profármacos y bioequivalentes

Los compuestos pueden comprender cualquiera de las sales, ésteres, o sales de dichos ésteres, farmacéuticamente

aceptables, o cualquier otro equivalente químico funcional que, tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o resto del mismo biológicamente activo. Por consiguiente, la descripción también puede presentar, por ejemplo, profármacos que comprendan los compuestos antisentido, que adicionalmente puedan comprender, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y de otros bioequivalentes.

El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva o menos activa que se convierte en una forma activa (es decir, fármaco) dentro del organismo o de las células del mismo mediante la acción de enzimas, productos químicos y/o condiciones endógenas. En particular, las versiones profarmacológicas de los compuestos se preparan como derivados de SATE ((S-acetil-2-tioetil)fosfato) de acuerdo con los procedimientos descritos en los documentos WO 93/24510 o WO 94/26764. Los profármacos pueden incluir compuestos antisentido en los que uno o ambos extremos comprenden nucleósidos que están escindidos (por ejemplo, enlaces estructurales fosfodiéster) para producir el compuesto activo.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del precursor y que no otorgan a los mismos efectos toxicológicos indeseados. Como ejemplo únicamente, las sales de sodio de los oligonucleótidos antisentido son útiles y bien aceptadas para la administración terapéutica en seres humanos. En otra realización, también se proporcionan sales de sodio de compuestos de ARN bicatenarios.

Formulaciones

Los compuestos también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o, asociarse, de otro modo, con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos. En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas comprenden un compuesto que modula la actividad de la DGAT-1. Más preferentemente, el compuesto es un inhibidor específico de la actividad de la DGAT-1. Más preferentemente, el compuesto es un compuesto antisentido. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de diversas maneras dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que vaya a tratarse.

Las formulaciones farmacéuticas, que pueden presentarse convenientemente en forma de farmacéutica unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de asociar los principios activos con el vehículo (o vehículos) o excipiente (o excipientes) farmacéutico. En general las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente los principios activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si fuera necesario, dar forma al producto (por ejemplo, en un tamaño de partícula específico para la administración).

Un "vehículo" o "excipiente" farmacéutico puede ser un disolvente, un agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte, farmacéuticamente aceptable, para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal y son conocidos en la técnica. El excipiente puede ser sólido o líquido y se selecciona teniendo en cuenta la manera de administración planificada para proporcionar el volumen, consistencia, etc., deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacológica determinada.

Combinaciones

Las composiciones pueden contener dos o más compuestos. En una realización preferida, los dos o más compuestos son moduladores de la actividad de la DGAT-1. En una realización adicional preferida, los dos o más compuestos son útiles para el tratamiento de la fibrosis hepática, bien directamente o tratando un factor etiológico causante. En otra realización relacionada, las composiciones pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos contra un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos contra una segunda diana de ácido nucleico. En un aspecto de esta realización, el primer ácido nucleico dirigido es la DGAT-1 y el segundo ácido nucleico dirigido está asociado con un factor etiológico subyacente para la fibrosis hepática; por ejemplo la DGAT-2. La DGAT-2 se ha desvelado como un tratamiento para la obesidad, diabetes, esteatosis hepática, colesterolemia y otras indicaciones similares. (Solicitud de Estados Unidos Publicada N° US2005-0272680). Como alternativa, las composiciones pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos contra diferentes regiones de la misma diana de ácido nucleico. Pueden usarse dos o más compuestos juntos o de manera secuencial.

Ejemplo 1: Tipos de células y procedimientos de transfección

Tipos de células. El efecto de los compuestos oligoméricos sobre la expresión de los ácidos nucleicos diana se sometió a ensayo en uno o más de los siguientes tipos de células.

Células HepG2: La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 se obtuvo de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Las células HepG2 se cultivaron rutinariamente en MEM Eagle complementado con suero fetal de ternero al 10%, aminoácidos no esenciales y piruvato sódico 1 mM (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90%, se sometieron rutinariamente a pases por tripsinización y dilución. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria N° 3872) a una densidad de 7000 células/pocillo para uso en análisis RT-PCR.

Células b.END: El Dr. Werner Risau del Instituto Max Plank (Bad Nauheim, Alemania) proporcionó la línea celular de endotelio de cerebro de ratón b.END. Las células b.END se cultivaron rutinariamente en DMEM, glucosa superior (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementada con suero fetal de ternero al 10% (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Cuando las células alcanzaron una confluencia del 90%, se sometieron rutinariamente a pases por tripsinización y dilución. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria N° 3872) a una densidad de 3000 células/pocillo para uso en análisis RT-PCR.

Para el análisis de transferencia Northern u otros, las células pueden sembrarse en placas de cultivo tisular de 100 mm u otras convencionales y tratarse de manera similar, usando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótidos.

Tratamiento con los compuestos oligoméricos: cuando las células alcanzan la confluencia apropiada, se tratan con los oligonucleótidos usando, como se describe, un procedimiento de transfección.

Lipofectin[™]. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 65-75%, se trataron con oligonucleótido. El oligonucleótido se mezcló con LIPOFECTIN[™] (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en medio sérico reducido con Opti-MEM[™]-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) para conseguir la concentración deseada del oligonucleótido y una concentración de LIPOFECTIN[™] de 2,5 ó 3 µg/ml por oligonucleótido 100 nM. Esta mezcla de transfección se incubó a temperatura ambiente aproximadamente durante 0,5 horas. Para las células cultivadas en placas de 96 pocillos, los pocillos se lavaron una vez con 100 µl de OPTI-MEMTM[™]-1 y después se trataron con 130 µl de la mezcla de transfección. Las células cultivadas en placas de 24 pocillos o en otras placas de cultivo tisular convencionales se trataron de manera similar, usando volúmenes apropiados de medio y oligonucleótido. Las células se trataron y los datos se obtuvieron por duplicado o por triplicado. Después de aproximadamente 4-7 horas de tratamiento a 37 °C, el medio que contenía la mezcla de transfección se sustituyó por medio de cultivo recién preparado. Las células se recogieron 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótido.

Oligonucleótidos de control

Los oligonucleótidos de control se usan para determinar la concentración óptima del compuesto oligomérico para una línea celular particular. Adicionalmente, cuando los compuestos oligoméricos de la invención se someten a ensayo en experimentos de exploración de compuestos oligoméricos o ensayos fenotípicos, los oligonucleótidos de control se someten a ensayo en paralelo con los compuestos de la invención.

La concentración del oligonucleótido usado varía de una línea celular a otra. Para determinar la concentración óptima de oligonucleótido para una línea celular particular, las células se tratan con un oligonucleótido de control positivo a una serie de concentraciones. La concentración de oligonucleótido de control positivo que da como resultado una inhibición del 80% del ARNm diana se utiliza entonces como la concentración de exploración para nuevos oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se consigue una inhibición del 80%, la concentración más baja del oligonucleótido de control positivo que da como resultado una inhibición del 60% del ARNm diana se utiliza entonces como la concentración de exploración de oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se consigue una inhibición del 60%, esta línea celular particular se considera como inadecuada para los experimentos de transfección de oligonucleótidos. Cuando el oligonucleótido antisentido se transfecta usando un reactivo liposómico, las concentraciones de los oligonucleótidos antisentido usados en el presente documento son de 50 nM a 300 nM y de 1 µM a 40 µM cuando el oligonucleótido antisentido se transfecta por electroporación.

Para células humanas el oligonucleótido de control positivo se selecciona ente el Oligo 13920 (TCGGTCATCGCTCCTCAGGG, SEC ID N°: 10) que está dirigido a la H-ras humana o el Oligo 18078, (GTGCGCGGAGCCCGAAATC, SEC ID N°: 11) que está dirigido a la Jun-N-terminal quinasa-2 (JNK2). Ambos controles son oligómeros con huecos (2'-O-metoxietil (2'-O-metoxietilos mostrados en negrita) con una estructura fosfotioato. Para células de ratón o de rata el oligonucleótido de control positivo es el Oligo 15770 (ATGCATTCTGCCCAAGGA, SEC ID N°: 12).

45 Ejemplo 2: Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real de los niveles de ARNm de la DGAT-1

La cuantificación de los niveles de ARNm de la DGAT-1 se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM[™] 7600, 7700 o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Antes de realizar el análisis por PCR cuantitativa, se evaluaron los conjuntos cebador-sonda específicos para la DGAT-1 que iba a medirse para determinar su capacidad para "formar complejos múltiples" con una reacción de amplificación con GAPDH. Después del aislamiento el ARN se sometió a una reacción de transcriptasa inversa (RT, *Reverse Transcriptase*) secuencial y PCR en tiempo real, ambas realizadas en el mismo pocillo. Los reactivos de la RT y PCR se obtuvieron de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). La PCR RT, se realizó también añadiendo un cóctel de PCR de 20 µl (tampón PCR 2,5x sin MgCl₂, MgCl₂ 6,6 mM, 375 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, 375 nM de cada uno de cebador directo y cebador inverso, 125 nM de sonda, 4 unidades de inhibidor RNAsa, 1,25 unidades de PLATINUM[®] Taq, 5 unidades de transcriptasa inversa MuLV y colorante ROX 2,5x) a placas de 96 pocillos que contenían una solución de ARN total 30 µl (20-200 ng). La reacción de RT se realizó por incubación

durante 30 minutos a 48 °C. Después de una incubación de 10 minutos a 95 °C para activar el PLATINUM® Taq, se realizaron 40 ciclos de un protocolo de PCR en dos etapas: 95 °C durante 15 segundos (desnaturalización) seguido por 60 °C durante 1,5 minutos (hibridación/extensión).

5 Las cantidades de los genes diana obtenidas por RT, PCR en tiempo real, se normalizaron usando el nivel de expresión de la GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o cuantificando el ARN total usando RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). La expresión de la GAPDH se cuantificó mediante RT, PCR en tiempo real, realizándose simultáneamente con la diana, formando complejos múltiples o individualmente. El ARN total se cuantificó usando el reactivo de cuantificación de ARN RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR).

10 En una placa de 96 pocillos que contenía ARN celular purificado 30 µl se introdujeron, mediante una pipeta, 170 µl de reactivo de trabajo RiboGreen™ (reactivo RiboGreen™ diluido 1:350 en Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). La placa se leyó en un CytoFluor 4000 (PE Applied Biosystems) con una excitación a 485 nm y una emisión a 530 nm.

15 Las sondas de PCR para la GAPDH tenían JOE unido covalentemente al extremo 5' y TAMRA o MGB unido covalentemente al extremo 3', en el que JOE es el colorante indicador fluorescente y TAMRA o MGB es el colorante extintor. En algunos tipos de células, para medir la expresión de la GAPDH, se usaron cebadores y sondas diseñados para una secuencia de GAPDH de una especie diferente. Por ejemplo, para medir la expresión de la GAPDH en células y líneas celulares derivadas de mono se usa un conjunto de cebador y sonda de la GAPDH humana.

20 Se diseñaron sondas y cebadores para su uso en la PCR en tiempo real para hibridarse con secuencias específicas de la diana. En la Tabla 2 se presentan los cebadores y las sondas y las secuencias de ácido nucleico diana a las cuales se hibridan. Las sondas de PCR específicas diana poseen colorante fluorescente y colorante extintor unidos covalentemente a los compuestos.

Tabla 2

Cebadores y sondas específicos de DGAT-1 para su uso en PCR en tiempo real				
Especie	SEC ID N° diana	Descripción de la secuencia	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
Ser humano		Cebador directo	TCCCCGCATCCGGAA	13
Ser humano		Cebador inverso	CTGGGTGAAGAACAGCATCTCA	14
Ser humano		Sonda	FAM- CGCTTTCTGCTGCGACGGATCC- TAMRA	15
Ratón		Cebador directo	GAAGGTGAAGGTCCGAGTC	16
Ratón		Cebador inverso	GAAGATGGTGATGGGATTC	17
Ratón		Sonda	JOE-CAAGCTTCCC GTTCTCAGCC- TAMRA	88

25 **Ejemplo 3: Inhibición antisentido de la expresión de la DGAT-1 humana mediante compuestos oligoméricos**

Se diseñó una serie de compuestos antisentido para dirigirse a regiones diferentes de ARN de la DGAT-1 humana, usando secuencias publicadas o partes de secuencias publicadas como las indicadas en la Tabla 1. La exploración identificó segmentos diana activos dentro de la secuencia de ARNm de la DGAT-1 humana, específicamente el N° GenBank (SEC ID N°: 4). Los compuestos indicados en la Tabla 3 son oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con huecos") de 20 nucleósidos de longitud, compuestos por una región "hueco" central que consiste en diez 2'-desoxinucleótidos que está flanqueada, en ambos lados (direcciones 5' y 3'), por cinco nucleótidos "alas". Las alas están compuestas por nucleótidos 2'-metoxietilo (2'-MOE). Los enlaces (estructurales) internucleósido son fosforotioato (P = S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos citosina son 5-metil citosina. Los datos son medias de tres experimentos en los que se trataron células HepG2 con 75 nM de los oligonucleótidos antisentido de la presente invención.

30

35

Tabla 3

Inhibición de los niveles de ARNm de la DGAT-1 humana mediante oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
COMPUESTO N°	REGIÓN	SEC ID N° DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEC ID N°
191617	5'UTR	4	1	gccgcctctctcgccattc	57	18
191619	5'UTR	4	21	gagccgctaactaatggacg	37	19
191621	5'UTR	4	41	acaacggctgcgttgctccg	30	20
191623	5'UTR	4	71	ccgcccgcgtcaggcccgtc	40	21
191625	5'UTR	4	91	gcctcaccagcgcgttcaac	20	22
191627	5'UTR	4	120	ccctgccggccgtagcc	24	23
191629	5'UTR	4	151	ctccgggcccctagacaacgg	45	24
191631	5'UTR	4	181	gttcgtagcggccgaggcgc	53	25
191633	5'UTR	4	211	cccggccgcagccaagcgtg	44	26
191635	Codón de inicio	4	231	gcccattggcctcagcccga	77	27
191637	Codificante	4	281	tggtcagaggccgcgaccc	58	28
191639	Codificante	4	301	ccgcaggcccgcgcccgcg	49	29
191641	Codificante	4	321	ccgcacctcttctccgccc	40	30
191643	Codificante	4	401	acgccggcgtctccgtcctt	92	31
191645	Codificante	4	421	gtcccagtgccgctgccc	60	32
191647	Codificante	4	441	ctgcaggcgtggcacctca	85	33
191649	Codificante	4	491	aggatgccacggtagtgtct	62	34
191651	Codificante	4	511	gcatcaccacacaccagttc	37	35
191653	Codificante	4	561	gccatactgatgaggttct	48	36
191655	Codificante	4	651	gacattggcccgaataacca	47	37
191657	Codificante	4	681	cttctcaacctggaatgcag	29	38
191659	Codificante	4	721	gcagtcccgcctgctccgtc	50	39
191661	Codificante	4	741	caggttggtactgtgcagca	31	40
191663	Codificante	4	781	ccagtaagaccagccgct	62	41
191665	Codificante	4	831	ggtgtgcgcatcagcgcca	59	42
191667	Codificante	4	931	cagcactgctggccttctc	52	43
191669	Codificante	4	1021	tgagctcgtagcacaaggtg	43	44
191671	Codificante	4	1121	cactgctggatcagccccac	20	45
191673	Codificante	4	1181	atgctgagtagtccatgtc	59	46

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm de la DGAT-1 humana mediante oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
COMPUESTO N°	REGIÓN	SEC ID N° DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEC ID N°
191675	Codificante	4	1231	tgagccagatgaggtgattg	62	47
191677	Codificante	4	1281	gagctcagccacggcattca	76	48
191679	Codificante	4	1351	tctgccagaagtaggtgaca	30	49
191681	Codificante	4	1611	gatgagcgacagccacacag	21	50
191683	Codificante	4	1671	ctcatagttgagcacgtagt	73	51
191685	3'UTR	4	1721	cagtgagaagccaggccctc	68	52
191687	3'UTR	4	1781	ccatcccagcactcgaggc	68	53
191689	3'UTR	4	1801	aggatgctgtgcagccaggc	73	54
191691	3'UTR	4	1851	ggtgcaggacagagcccat	72	55
191693	3'UTR	4	1881	gtgtctggcctgctgtcgcc	71	56
191695	3'UTR	4	1901	ctcccagctggcatcagact	76	57

Como se muestra en la Tabla 3, en este ensayo, las SEC ID Nos 18, 25, 27, 28, 31, 32, 33, 34, 39, 41, 42, 43, 46, 47, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 56 y 57 demostraron una inhibición de la expresión de la DGAT-1 humana de al menos el 50% y son, por lo tanto, preferidas. Son más preferidas las SEC ID Nos: 31, 33, 27 y 57. En el presente documento, las regiones diana con las que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan "segmentos diana preferidos" y son, por lo tanto, preferidas para dirigirse por los compuestos de la presente invención. En la Tabla 3 se muestran estos segmentos diana preferidos. En la Tabla 1 se muestran las secuencias que representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (5' - la mayoría) sobre el ácido nucleico diana particular al cual se une el oligonucleótido. En la Tabla 3 también se muestra la especie en la que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Ejemplo 4: Inhibición antisentido de la expresión de la DGAT-1 de ratón mediante oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi.

De acuerdo con la presente invención, se diseñó una segunda serie de compuestos antisentido para dirigirse a diferentes regiones del ARN de la DGAT-1 de ratón, usando secuencias publicadas (número de acceso GenBank AF078752.1, incorporado en el presente documento como SEC ID N°: 7). Los compuestos se muestran en la Tabla 4. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (5'-la mayoría) sobre el ácido nucleico diana particular al cual se une el compuesto. Todos los compuestos indicados en la Tabla 4 son oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con hueco") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos por una región "hueco" central que consiste en diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas por nucleótidos 2'-metoxietilo (2'-MOE). Los enlaces (estructurales) internucleósido son fosforotioato (P = S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos citosina son 5-metil citosina. Los compuestos se analizaron para determinar su efecto sobre los niveles de ARNm de la DGAT-1 de ratón mediante PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en los otros ejemplos en el presente documento. Los datos son medias de tres experimentos en los que células b.END se trataron con los oligonucleótidos antisentido de la presente invención. Si está presente, "N.D." indica que "no hay datos".

Tabla 4

Inhibición de los niveles de ARNm de DGAT-1 de ratón mediante oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
COMPUESTO N°	REGIÓN	SEC ID N° DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEC ID N°
191723	5'UTR	7	1	ctactatttcattcatcc	2	58
191724	5'UTR	7	21	tatcctaagatgcctaatt	0	59
191725	5'UTR	7	31	gcttgagccctatcctaagt	0	60
191726	5'UTR	7	61	ctcgtcgcggcccaatctc	21	61
191727	Codón de inicio	7	81	cccatggctcggcccgcac	48	62
191729	Codificante	7	191	cagccgcgtctcgcacctcg	74	63
191730	Codificante	7	232	cggagccggcgcgtcacccc	63	64
191731	Codificante	7	281	ccacgctggccgcccgtct	67	65
191732	Codificante	7	301	cagatcccagtagccgtcgc	59	66
191733	Codificante	7	321	tcttgacagcagtaggcacct	49	67
191734	Codificante	7	371	tcaggataccacgataattg	48	68
191735	Codificante	7	391	cagcatcaccacacaccaat	52	69
191736	Codificante	7	411	aacctgcattactcaggat	62	70
191737	Codificante	7	451	atccaccaggatgccatact	29	71
191738	Codificante	7	471	agagacaccacctggatagg	42	72
191740	Codificante	7	601	cagcagccccatctgctctg	63	73
191741	Codificante	7	621	gccaggtaaccacatgtag	58	74
191742	Codificante	7	661	aaccagtaaggccacagctg	16	75
191743	Codificante	7	681	cccactggagtgatagactc	42	76
191744	Codificante	7	711	atggagtatgatccagagc	53	77
191745	Codificante	7	771	accctcgctggcggcacca	68	78
191746	Codificante	7	841	tggatagctcacagcttgct	56	79
191747	Codificante	7	861	tctcggtaggtcaggtgtc	32	80
191748	Codificante	7	961	ctcaagaactcgctgtagca	60	81
191749	Codificante	7	1001	gttgatcagccccacttga	37	82
191750	Codificante	7	1061	gtgaatagtcataatccttg	48	83
191751	Codificante	7	1081	taagagacgctcaatgatcc	18	84
191752	Codificante	7	1161	tctgccacagcattgagaca	50	85

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm de DGAT-1 de ratón mediante oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
COMPUESTO N°	REGIÓN	SEC ID N° DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEC ID N°
191753	Codificante	7	1201	ccaatctctgtagaactcgc	55	86
191754	Codificante	7	1221	gtgacagactcagcattcca	56	87
191755	Codificante	7	1271	gtctgatgcaccactgtgc	72	88
191756	Codificante	7	1301	tgccatgtctgagcataggc	70	89
191757	Codificante	7	1331	atactctgtcctggccacc	65	90
191759	Codificante	7	1471	attgcatagtcccttgga	68	91
191760	Codificante	7	1491	agtgtcaccacacagctgc	66	92
191761	Codificante	7	1511	ccaccggtgccaatgatg	71	93
191762	Codificante	7	1531	gtggacatacatgagcacag	62	94
191763	Codificante	7	1551	tagttgagcacgtagtagtc	40	95
191764	Codón de terminación	7	1586	cttggcagtagctcatacc	37	96
191765	3'UTR	7	1621	tccagaactccaggcccagg	59	97

Como se muestra en la Tabla 2, en este ensayo, las SEC ID Nos: 63, 64, 65, 66, 69, 70, 73, 74, 77, 78, 79, 81, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 y 97 demostraron una inhibición de la expresión de la DGAT-1 de ratón de al menos el 50% y son, por lo tanto, preferidas. Son más preferidas las SEC ID Nos: 63, 88, 91 y 93. En el presente documento, las regiones diana con las que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan "segmentos diana preferidos" y son, por lo tanto, preferidas para dirigirse por los compuestos de la presente invención. En la Tabla 3 estos segmentos diana de ARNm preferidos se muestran como la secuencia de ARN apropiada, en la que la timina (T) se ha sustituido con uracilo (U) para reflejar una representación correcta de una secuencia de ARN. En las Tablas 1 y 2 se muestran las secuencias que representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (5' - la mayoría) sobre el ácido nucleico diana particular al cual se une el oligonucleótido. En la Tabla 3 también se muestra la especie en la que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Ejemplo 5: Análisis de transferencia de Western de los niveles de la DGAT-1

Usando procedimientos convencionales, se realizó análisis de transferencia de Western (análisis de inmunotransferencia). Las células se recogieron de 16 a 20 horas después del tratamiento con el oligonucleótido, se lavaron una vez con PBS, se suspendieron en tampón de Laemmli (100 µl/pocillo), se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 16%. Los geles se procesaron durante 1,5 horas a 150 V y se transfirieron a una membrana para realizar la transferencia de Western. Se usó un anticuerpo primario apropiado dirigido a la DGAT-1, con un anticuerpo secundario radiomarcado o marcado con un marcador fluorescente dirigido a la especie de anticuerpo primario. Las bandas se visualizaron usando un instrumento PHOSPHORIMAGER® (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA).

Ejemplo 6: Inhibición antisentido de la expresión de la DGAT-1 de ratón: respuesta a la dosis en células b.END

De acuerdo con la presente invención, se investigaron adicionalmente seis oligonucleótidos dirigidos contra la DGAT-1 de ratón, el CMP N° 191729 (SEC ID N°: 63), CMP N° 191731 (SEC ID N°: 65), CMP N° 191755 (SEC ID N°: 88), CMP N° 191756 (SEC ID N°: 89), CMP N° 191759 (SEC ID N°: 91) y CMP N° 191761 (SEC ID N°: 93) en un estudio de respuesta a la dosis.

En el experimento de respuesta a la dosis, con los niveles de ARNm como criterio de valoración, las células b.END se trataron con los compuestos CMP N° 191729, CMP N° 191731, CMP N° 191755, CMP N° 191756, CMP N° 191759 o CMP N° 191761 a dosis de 1, 5, 10, 25, 50 y 100 nM del oligonucleótido. Los datos se obtuvieron mediante

PCR cuantitativa en tiempo real, como se describe en otros ejemplos en el presente documento y se realizó el promedio de tres experimentos y se normalizó frente a las células de control no tratadas. Los datos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Inhibición de los niveles de ARNm de la DGAT-1 de ratón mediante oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi: respuesta a la dosis							
CMP N°	SEC ID N°	Dosis (nM)					
		1	5	10	25	50	100
% de inhibición							
191729	63	26	62	78	80	83	83
191731	65	27	58	57	58	82	85
191755	88	41	59	72	75	83	79
191756	89	13	39	59	65	81	75
191759	91	26	44	74	80	82	86
191761	93	23	63	71	80	85	87

5

Los datos presentados en la Tabla 5 indican que los compuestos antisentido son capaces de reducir los niveles de ARNm de la DGAT-1 de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 7: Efecto de la inhibición antisentido de la DGAT-1 (CMP N° 191761) sobre la fibrosis hepática – estudios *in vivo*

10 La leptina es una hormona producida por el tejido adiposo que regula el apetito. Los déficits en esta hormona tanto en seres humanos como en animales no humanos conducen a la obesidad. Los ratones db/db tienen una mutación en el gen receptor de leptina que da como resultado la obesidad, hiperglucemia e hígado graso, y por tanto, estos ratones son buenos modelos de esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). En este ejemplo, se sometieron a ensayo los compuestos oligoméricos de la presente invención en el modelo de EHNA de ratones db/db.

15 Se alimentó a ratones macho db/db, C57B1/6J-Lepr (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), de seis semanas de vida, con una dieta de control (pienso, n = 6) o con una dieta deficiente en metionina y colina (dieta DMC). Los ratones alimentados con dieta DMC se separaron posteriormente en grupos placebo (tratamiento con solución salina) o grupos de tratamiento (tratamiento con el compuesto antisentido DGAT-1). A los grupos de placebo y de tratamiento se les inyectó, por vía intraperitoneal, solución salina o el compuesto antisentido, dos veces a la semana durante cuatro semanas (n = 8) o durante ocho semanas (n = 7). Para ambos, el tratamiento de cuatro semanas y el tratamiento de nueve semanas hubo miembros de ratones placebo y miembros de ratones con tratamiento. El grupo de tratamiento recibió 25 mg/kg del CMP N° 191761 en cada inyección. Al final del período de tratamiento se extrajo suero y se sacrificó a los ratones.

25 Usando PCR en tiempo real de ARN total, de tejido de hígado completo, se evaluó la expresión del ARNm de DGAT-1, TNF.alfa, TGF.beta, aSMA, colágeno y TIMP-1. La esteatosis hepática se evaluó mediante el contenido en triglicéridos usando tinción de aceite rojo y Hematoxilina-Eosina (HE). También se midió el ALT y otros parámetros en suero.

30 Las células estrelladas hepáticas (CEH) y células parenquimáticas se separaron usando técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia y se determinaron los niveles de ARNm de la DGAT-1. Las CEH expresaron siete veces más ARNm de DGAT-1 que los hepatocitos. En el grupo placebo los niveles de ARNm de la DGAT-1 se encontraron aproximadamente al 70% en la semana 4, pero volvieron a la línea basal a la semana 8. No hubo ninguna diferencia significativa en la expresión de la DGAT-2 entre los grupos. Por tanto, el compuesto antisentido DGAT-1 es específico para la DGAT-1: (Figura 1). El ARNm de la DGAT-1 del grupo que recibió tratamiento se encontró aproximadamente al 95% a la semana 4 y permaneció en ese nivel en la semana 8. Sin embargo, el tratamiento con el compuesto antisentido DGAT-1 no protegió al grupo de tratamiento de la esteatosis hepática. Durante el estudio, las puntuaciones del contenido en triglicéridos y esteatosis hepática fueron similares en tanto en el grupo de placebo como en el grupo de tratamiento (siendo en los dos grupos aproximadamente 2-3 veces mayor que en el grupo de control alimentado con pienso). De manera similar, los niveles de AST en suero fueron comparables para los grupos de placebo y de tratamiento (618 ± 80 y 557 ± 49 frente a 130 ± 10 UI/l p < 0,01). (Figuras 2 y 3)

40

La inhibición de la DGAT-1 disminuyó la fibrosis hepática inducida por la dieta DMC. En comparación con los hígados del grupo placebo, el grupo de tratamiento tuvo una tinción con rojo sirio menos intensa y niveles más bajos 20-30% de hidroxiprolina hepática ($p < 0,05$ en ambos). (Figura 4). La expresión hepática del ARNm de TGF.β, aSMA y colágeno disminuyeron en 48%, 67% y 58%, respectivamente. (Figura 5). La inhibición de la DGAT-1 en el hígado reduce la activación de las CEH y la fibrosis hepática en modelos de ratón de EHNA.

Ejemplo 8: Efectos de la inhibición antisentido de la DGAT-2 (CMP N° 217376) sobre la fibrosis hepática – estudios *in vivo*

La DGAT-2 se expresa en los hepatocitos y se asocia con la esteatosis hepática. El tratamiento con un compuesto antisentido que inhibe la expresión de la DGAT-2 mejora la esteatosis hepática en ratones obesos (Solicitud de Patente de Estados Unidos N°: US2005-0272680). El hígado graso es un factor etiológico causante de la fibrosis hepática.

Se alimentó a ratones macho db/db, C57B1/6J-Lepr (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), de seis semanas de vida, con una dieta de control (pienso, $n = 6$) o con una dieta deficiente en metionina y colina (dieta DMC). Los ratones alimentados con dieta DMC se separaron posteriormente en grupos placebo (tratamiento con solución salina) o grupos de tratamiento (tratamiento con el compuesto antisentido DGAT-2). A los grupos de placebo y de tratamiento se les inyectó, por vía intraperitoneal, solución salina o el compuesto antisentido, dos veces a la semana durante cuatro semanas ($n = 8$) o durante ocho semanas ($n = 7$). Para ambos, el tratamiento de cuatro semanas y el tratamiento de nueve semanas hubo miembros de ratones placebo y miembros de ratones con tratamiento. El grupo de tratamiento recibió 25 mg/kg del CMP N° 217376 (tccattattagtctaggaa; SEC ID N°: 99) en cada inyección. El CMP N° 217376 es un oligonucleótido quimérico (“con huecos”) de 20 nucleósidos de longitud y dirigido al ARNm de la DGAT-2 de ratón (N° de acceso Gen Bank: AK002443.1, 15 de febrero de 2001 y SEC ID N°: 100), compuesto por una región “hueco” central que consiste en diez 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por “alas” de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas por nucleótidos 2-O-metoxietilo (2'-MOE). Los enlaces (estructurales) internucleósido son fosforotioato (P = S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los restos de citosina son 5-metil citocinas. Al final del período de tratamiento se extrajo el suero y se sacrificó a los ratones.

Usando PCR en tiempo real de ARN total, de tejido de hígado completo, se evaluó la expresión del ARNm de la DGAT-2, TNF.α, TGF.β, a-SMA, colágeno y TIMP-1 usando PCR en tiempo real del ARN total a partir de tejidos de hígado completo. Las células se aislaron usando técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia. La esteatosis hepática se evaluó mediante el contenido en triglicéridos usando tinción de aceite rojo y Hematoxilina-Eosina (HE). También se midió el ALT y otros parámetros en suero.

Las células estrelladas hepáticas (CEH) y células parenquimáticas se separaron usando técnicas convencionales conocidas por los expertos habituales en la materia y se determinaron los niveles de ARNm de la DGAT-1. Los hepatocitos expresaron aproximadamente 150 veces más ARNm de la DGAT-2 que las CEH. La expresión hepática del ARNm de la DGAT-2 no cambió con alimentación con dieta DMC en comparación con la dieta con pienso normal. Sin embargo, hubo una reducción mayor del 90% en la expresión de la DGAT-2 en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo placebo (8 semanas; $p < 0.001$ frente a controles). El compuesto antisentido DGAT-2 no cambió significativamente la expresión de la DGAT-1 (Figura 6). El contenido de triglicéridos en hígado aumentó aproximadamente 2 veces en el grupo control sobre el grupo placebo. De manera similar, los niveles de ALT en suero y la expresión hepática del ARNm de TGF.β, a-SMA, TIMP-1 y colágeno aumentó 6 veces, 2 veces, 4 veces, 10 veces y 6 veces, respectivamente, en los ratones de control sobre los ratones placebo ($p < 0,01$ frente a control). El nivel de hidroxiprolina fue de 40% más elevado en el grupo alimentado con dieta DMC en comparación con el grupo control (8 semanas; $p < 0,05$) y la tinción con rojo sirio fue más intensa. (Figuras 7 y 8)

El grupo de tratamiento tuvo una puntuación de esteatosis hepática reducida en comparación con el grupo placebo (puntuación 1 del grupo de tratamiento frente a puntuación 4 del grupo placebo), y el contenido hepático de triglicéridos se redujo aproximadamente al 35% en el grupo de tratamiento. Los niveles de ARNm hepáticos para TNF.α y TGF.β se redujeron en el grupo de tratamiento, pero hubo un aumento en los niveles de ALT en suero, expresión hepática de ARNm de a-SMA y TIMP-1 de 3 veces, 2 veces y 6 veces, respectivamente. (Figura 9) No hubo diferencias significativas entre el grupo placebo y el grupo de tratamiento para la expresión hepática de ARNm de colágeno y fibronectina. La DGAT-2 es un tratamiento eficaz para la esteatosis hepática; sin embargo, en este modelo de ratón, después de 8 semanas de tratamiento, no hubo ninguna mejoría significativa en la fibrosis hepática.

Ejemplo 9: Inhibición antisentido de la expresión de la DGAT-1 en rata por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi

Se diseñó una serie de compuestos antisentido contra diferentes regiones diana del ARN de la DGAT-1 de rata, usando información de secuencia publicada (número de acceso GenBank AF296131.1, incorporado en el presente documento como SEC ID N°: 101). Los compuestos se muestran en la Tabla 6. El “sitio diana” indica el número del primer nucleótido (5' - la mayoría) sobre la secuencia diana particular a la cual se unen los compuestos. Todos los compuestos indicados en la Tabla 6 son oligonucleótidos quiméricos (“con hueco”) de 20 nucleótidos de longitud,

compuestos por una región "hueco" central que consiste en diez 2'-desoxinucleótidos que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas por nucleótidos 2'-metoxietil (2'-MOE). Los enlaces (estructurales) internucleósido son fosforotioato (P=S) a lo largo del nucleótido. Todos los restos de citosina son 5-metil citosina.

5 Los compuestos se analizaron para determinar su efecto sobre los niveles de ARNm de la DGAT-1 en rata mediante PCR cuantitativa en tiempo real, como se ha descrito en otros ejemplos en el presente documento. Se diseñaron sondas y cebadores contra la DGAT-1 de rata para hibridarse con una secuencia de DGAT-1 de rata usando información de secuencia publicada (número de acceso GenBank AF296131.1, incorporado en el presente documento como SEC ID N°: 101). Para la DGAT-1 de rata los cebadores de la PCR fueron: cebador directo: 10 CAGACCAGCGTGGGCG (SEC ID N°: 102); cebador inverso: GAACAAAGAGTCTTGCAGACGATG (SEC ID N°: 103) y la sonda de la PCR fue: FAM-CGGCCACTGGGAGCTGAGGTG-TAMRA (SEC ID N°: 104) en la que FAM es el colorante indicador fluorescente y TAMRA es el colorante extintor. Las cantidades génicas diana de rata se normalizaron cuantificando el ARN total usando el reactivo de cuantificación de ARN, RiboGreen™.

15 Los datos son medias de tres experimentos en los que se trataron hepatocitos primarios de rata con 50 nM de los oligonucleótidos antisentido de la presente invención. Los datos, mostrados en la Tabla 6, se presentan como inhibición en porcentaje normalizados frente a las muestras de control sin tratar.

Tabla 6

Inhibición de los niveles de ARNm de la DGAT-1 de rata por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
CMP N°	REGIÓN	SEC ID N° DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEC ID N°
191726	5'UTR	7	1	ctcgtcgcggcccaatcttc	0	61
191733	Codificante	7	261	tcttgacagacgatggcacct	68	67
327788	Codón de Inicio	101	24	TCGCCCATGGCTTCGGCCCG	0	105
327789	Codificante	101	44	AGCTTCCCGCGCCTCCGCGG	0	106
327790	Codificante	101	61	GGTCCTGCGACGCCGAGAGC	0	107
327791	Codificante	101	82	CTGGACGGAAACCCGCGAGC	0	108
327792	Codificante	101	103	TACCTTGGGCCCACTACCTC	0	109
327793	Codificante	101	121	TCGCACCTCGTCCTTCTTA	0	110
327794	Codificante	101	170	GAGCCGGCGCGTCACCCCG	0	111
327795	Codificante	101	191	TATGGGCTGGAGCCGGAGCC	0	112
327796	Codificante	101	196	CCGGGTATGGGCTGGAGCCG	0	113
327797	Codificante	101	225	TCGCCACGCTGGTCTGCCG	63	114
327798	Codificante	101	248	GGCACCTCAGCTCCAGTGG	64	115
327799	Codificante	101	282	CTGTCTGAGCTGAACAAAGA	0	116
327800	Codificante	101	309	AGGATACCACGGTAATTGCT	0	117
327801	Codificante	101	318	CACCAATTCAGGATACCACG	0	118
327802	Codificante	101	345	GCATTACTCAGGATCAGCAT	0	119
327803	Codificante	101	359	CTAAAGATAACCTTGCATTA	0	120
327804	Codificante	101	374	ACTTGATAAGATTCTCTAAA	0	121
327805	Codificante	101	389	CCACCAGGATGCCATACTTG	0	122
327806	Codificante	101	393	GGATCCACCAGGATGCCATA	0	123
327807	Codificante	101	415	AAACAGAGACACCACCTGGA	0	124
327808	Codificante	101	463	GGATGCAATGATCAAGCATG	0	125
327809	Codificante	101	477	ACAATAAAGATATTGGATGC	0	126
327810	Codificante	101	499	CTTCTCAATCTGAAATGTAG	0	127
327811	Codificante	101	504	AGGCGCTTCTCAATCTGAAA	0	128
327812	Codificante	101	527	GCTCTGTCAGGGCACCCACT	0	129
327813	Codificante	101	537	AGCCCATCTGCTCTGTGAG	20	130
327814	Codificante	101	552	ACCACATGTAGCAGCAGCCC	17	131
327815	Codificante	101	579	GGGAAGCAGATAATTGTGGC	0	132
327816	Codificante	101	594	AAGGCCACAGCTGCTGGGAA	0	133
327817	Codificante	101	607	AGACTCAACCAGTAAGGCCA	25	134
327818	Codificante	101	616	TGGAGTGATAGACTCAACCA	2	135
327819	Codificante	101	649	GGAGTATGATGCCAGAGCAA	0	136
327820	Codificante	101	661	GAGGAAGATGATGGAGTATG	0	137
327821	Codificante	101	679	CCGGTAGGAAGAAAGCTTGA	0	138

(continuación)

Inhibición de los niveles de ARNm de la DGAT-1 de rata por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi						
CMP N°	REGIÓN	SEC ID N° DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% INHIB	SEC ID N°
327822	Codificante	101	709	CCTTCGCTGGCGGCACCACA	29	139
327823	Codificante	101	726	ACAGCTTTGGCCTTGACCCT	0	140
327824	Codificante	101	744	ACCTTCTTCCCTGCAGACAC	0	141
327825	Codificante	101	758	CAGCAGCCCCACTGACCTTC	6	142
327826	Codificante	101	779	GATAGCTTACAGTGTTCTGG	0	143
327827	Codificante	101	797	GGTAGGTCAGGTTGTCCGGA	0	144
327828	Codificante	101	806	AGAGATCTCGGTAGGTCAGG	0	145
327829	Codificante	101	819	AAGATGAAGTAATAGAGATC	0	146
327830	Codificante	101	833	ACAAAGTAGGAGCAAAGATG	0	147
327831	Codificante	101	849	AAGTTGAGTTCATAACACAA	0	148
327832	Codificante	101	912	AAAAAGAGCATCTCAAGAAC	0	149
327833	Codificante	101	934	CAGCCCCACTTGAAGCTGGG	0	150
327834	Codificante	101	949	CATCCACTGCTGGATCAGCC	0	151
327835	Codificante	101	970	GGAGTTCTGGATAGTAGGGA	0	152
327836	Codificante	101	981	AAGGGCTTCATGGAGTTCTG	0	153
327837	Codificante	101	991	CATGTCCCTTGAAGGGCTTCA	0	154
327838	Codificante	101	1030	CGCCAGCTTTAAGAGACGCT	0	155
327839	Codificante	101	1103	GCTCTGCCACAGCATTGAGA	0	156
327840	Codificante	101	1131	TAGAACTCGCGGTCTCCAAA	0	157
327841	Codificante	101	1162	GGTGACAGACTCAGCATTCC	0	158
327842	Codificante	101	1186	GATATTCCAGTTCTGCCAAA	0	159
327843	Codificante	101	1212	TGTCTGATGCACCACTTGTG	0	160
327844	Codificante	101	1271	AGACCCCAGTCCTGGCCATC	22	161
327845	Codificante	101	1299	TACTCATGAAAGAAAGCTGA	0	162
327846	Codificante	101	1351	CATTGCTGTGAATGCCAAA	0	163
327897	Codificante	101	1380	ACAATCCAGGCCAGTGGGAC	0	164
327848	Codificante	101	1414	TGCATTGCCATAGTTCCCTT	0	165
327849	Codificante	101	1442	GCCCAATGATGAGTGTACC	0	166
327850	Codificante	101	1477	GTAGTCGTGGACATACATGA	0	167
327851	Codón de terminación	101	1524	TTGGCAGTAGCTCATGCCCC	0	168
327852	Codón de terminación	101	1531	CTGGCCTTTGGCAGTAGCTC	12	169
327853	3' UTR	101	1562	CCTCCAGAACTCCAGGCCCA	55	170
327854	3' UTR	101	1637	ATCCCCAAGAGCAGGAGTAG	0	171
327855	3' UTR	101	1670	CCCAGCACTGGCTCAACCAG	0	172
327856	3' UTR	101	1702	TTGATATCCTAAGCCCCTGG	0	173
327857	3' UTR	101	1727	TTTTTTTTTTTAGATAGCT	0	174

5 Como se muestra en la Tabla 6, en este ensayo, las SEC ID Nos: 67, 114, 115, 130,131, 134, 139,161, 169 y 170 demostraron una inhibición de la DGAT-1 de rata de al menos un 10%. Las SEC ID Nos: 61 y 67 son oligonucleótidos antisentido ínter especie que se dirigen contra la DGAT-1 tanto de ratón como de rata.

Ejemplo 30: Inhibición antisentido de la DGAT-1 de rata por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos que tienen alas 2'-MOE y un hueco desoxi: respuesta a la dosis

10 En una realización adicional, se seleccionaron seis oligonucleótidos para realizar una investigación adicional en un experimento de respuesta a la dosis en hepatocitos primarios de rata. Los hepatocitos primarios de rata se trataron con 1, 5, 10, 25, 50 y 100 nM de CMP N° 191733 (SEC ID N°: 67), CMP N° 327798 (SEC ID N°: 115), CMP N° 327814 (SEC ID N°: 131), CMP N° 327817 (SEC ID N°: 134), CMP N°: 327822 (SEC ID N°: 139), CMP N° 327844 (SEC ID N°: 161) y CMP N° 327853 (SEC ID N°: 170). Las células sin tratar sirvieron como control. Se midieron los niveles de ARNm diana mediante PCR en tiempo real, como se ha descrito en otros ejemplos en el presente documento. Los datos, presentados en la Tabla 7, son la media de tres experimentos y están normalizados con respecto a muestras de control no tratadas.

15

Tabla 7

Inhibición de la DGAT-1 de rata por oligonucleótidos fosforotioato quiméricos: respuesta a la dosis							
CMP N°	SEC ID N°	Dosis de oligonucleótido					
		5	10	25	50	100	200
% de inhibición							
191733	67	20	53	77	91	97	99
327798	115	0	13	68	88	96	98
327814	131	0	5	37	72	80	89
327817	134	0	0	0	57	76	87
327822	139	0	32	52	73	88	95
327844	161	0	0	17	66	71	87
327853	170	0	0	48	70	80	92

Como se demuestra en la Tabla 7, los siete oligonucleótidos antisentido sometidos a ensayo fueron capaces de inhibir la expresión de la DGAT-1 de una manera dependiente de la dosis.

ES 2 397 661 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc. Xiag-Xian Yu Sanjay Bhanot Brett P. Monia

5 <120> COMPOSICIONES Y SUS USOS DIRIGIDOS CONTRA LA DIACILGLICEROL ACILTRANSFERASA 1

<130> BIOL0088WO

<160> 174

10 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 384

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

tttccccgct ctccccgcat cgggaagcgc tttctgctgc gacggatcct tgagatgctg 60
ttcttcagcc agctccaggt ggggctgatc cagcagtgga tgggtccccac catccagaac 120
tccatgaagc ccttcaaggt gagtggctca ggtgctcttg cagctggggg ggctggggag 180
tgaccaggag catggctagc tgaacggctt gtttctgcag gacatggact actcacgcat 240
catcgagcgc ctctgaagc tggcggctcc caatcacctc atctggctca tcttcttcta 300
ctggctcttc cactcctgcc tgaatgccgt ggctgagctc atgcagtttg gagaccggga 360
gttctaccgg gactggtgga actc 384

```

<210> 2

<211> 494

<212> ADN

25 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

gagccatcag tggatggtcc ccaccatcca gaactccatg aagcccttca aggacatgga 60
ctactcacgc atcatcgagt gcctcctgaa gctggcggtc cccaatcacc tcatctggct 120
catcttcttc tactggctct tccactcctg cctgaatgcc gtggctgagc tcatgcagtt 180
tggagaccgg gagttctacc gggactggtg gaactccgag tctgtcacct acttctggca 240
gaactggaac atccctgtgc acaagtgggtg catcaggtag gtgggggtgtg tgtgtgtgtg 300
atgtggaaca tggctgtgaa cctgaaccgc tttccatgcc cctcctotg cagacacttc 360
tacaagccca tgcttcgacg gggcagcagc aagtggatgg ccaggacagg ggtgttctctg 420
gcctcggcct tcttccacga gtacctggtg agcgtccctc tgcgaatgtt ccgcctctgg 480
gcgttcacgg gcat 494

```

<210> 3

<211> 21001

<212> ADN

35 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808

40 <223> n = A, T, C o G

<220>

<221> misc_feature

45 <222> 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855

<223> n = A, T, C o G

50 <220>

ES 2 397 661 T3

<221> misc_feature
 <222> 856, 857, 858, 859, 860, 861, 10947, 10948, 10949, 10950, 10951, 10952, 10953, 10954, 10955, 10956, 10957, 10958, 10959, 10960, 10961, 10962, 10963, 10964, 10965, 10966, 10967, 10968, 10969, 10970, 10971, 10972, 10973, 10974, 10975
 5 <223> n = A, T, C o G

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 10976, 10977, 10978, 10979, 10980, 10981, 10982, 10983, 10984, 10985, 10986, 10987, 10988, 10989, 10990, 10991, 10992, 10993, 10994, 10995, 10996, 10997, 10998, 10999, 11000, 11001, 11002, 11003, 11004, 11005, 11006, 11007, 11008
 10 <223> n = A, T, C o G
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 11009, 11010, 11011, 11012, 11013, 11014, 11015, 11016, 11017, 11018, 11019, 11020, 11021, 11022, 11023, 11024, 11025, 11026, 11027, 11028, 11029, 11030, 11031, 11032, 11033, 11034, 11035, 11036, 11037, 11038, 11039, 11040, 11041
 15 <223> n = A, T, C o G

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 11042, 11043, 11044, 11045, 11046
 20 <223> n = A, T, C o G

 <400> 3
 25

```

tctctactaa aaatacaaaa attagctggg catggtggtg cgtgcctgta gtgccagcta 60
ctcaggaggc tgaggcagga gaatcacttg aagtcaggag gcgggtttcg gtgagctaaa 120
attgcgccac tgcactccag cctggcgaca gagcgagact ccgtctcaaa aaacaaaaaa 180
agatctgcag aatgggcagc ctgtgtccat gccaccctca ctccctgcca ccctcaaggg 240
tgcccagggtg agatggggtg ggggacagta tggacggtgg catcctctgg agagatgggg 300
ttccaaggct gtctgtgaag gtaaaggatg gcagcaaggg ggcagggctg aggcagcaga 360
ggtcacagga gggccaaggt cacctgcagc ctgaggtcca ctaggaagag aggaggacac 420
caggaggaaag ggtctccaag cctggggag gcaaggtctg caggaagag agcccagtta 480
aggcaggaag tgggggacat cctgggtatc tgttgagcag gtactgggct cctgggggag 540
atthagcaa gaggatgggg tagaggggtg tccccaggcc tggcccaggt taggaggata 600
tcagggtggg agccctggga gaactctggg gaccagctgg gcagccctgg aatgaggcgc 660
caggcagcgg gcagaccaca cacaggtgca cagggagggg ctgaggtcag agtggttct 720
ccaaggctgg ccatggccag aggcctgtcc ctgctttctg tnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 780
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 840
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nccccatgt gccccgcgc cttgtacata ttcccaccg 900
gaataggccg ggatttttac tggggccgtg cccttcttcc gccccattt ggggccagge 960
cggccggaca gacggacgga cggacagacc tcttctctaa gcacaatagc accagctccc 1020
cggagcaccg cacctccaca aggagaataa atgccactct tgatagaatt tggagtgtcg 1080
ggctgatgtg tccctgggctg ggcccccgct gtgggtggc tgggagggc tcccagctct 1140
ggcagtacct cagaggctgg tgctgcaagg gtcagcctga ggcctttcac aagacggccc 1200
tcttctcca ctggggaggg caggcttggc aggcccaacc acaggagcat caggtctgaa 1260
ggcaaagtag ttggcatttc ccctggggtg ggtggatctg ctccacacca ggaacaggag 1320
cactaagggg ttccagctca aagtcaggcc aagcccagg ttggaccaga gtgggcaggg 1380
taggtatagt aggagctgct gttccccagc ctgggtgcct tcgctcttct ctccctgaag 1440
gagctttatg ctgtgatgga aggcctgata gccaccctca gccctctgag atgctgttgc 1500
aggaaatggg gacagtggag agttcgaggt ctggccctt tectgtggcc tgctgccac 1560
attctgacce ccaggcttcc cagatatgct cccccagtgt ctgcggatgc ctccatggat 1620
agctgggttg gaccggttcc agggaggagg tgcccagggg gcagagaggc ttctgcaacc 1680
atcgcccaag ggctctagac agaatgagta gtggaggaga taagggacag ggaccctttg 1740
cccagcaatg tcccctggtg accaggtagg caggcatgag ccgagaggcc caaagtcttc 1800
  
```

gggcacatac attcaaacca ggtcagtoct agatccaggg ccagcaaage tgcccacacc 1860
 ctagcagggg caggggacag acctgccag actccactag ggtggagagc aggggaacca 1920
 ggtctgcagc atgtcatggt ctgtgtgect ggcacttggg ggagctgtgg tgcaggtggg 1980
 tgctctcttt gggagagcac taccagcaat gacaatggca gacagcaatg gccaggagga 2040
 aggtccttag cctcactcct tccaaaggac tccaacagcg actggctgtt tctacttctc 2100
 caggattctg atgcttagag tgggtggaag gatggaggtg gectccctga ggctgggat 2160
 gagctcgacc ccccagttcc tcccagccac agacactagt ttccctctga atgagcagca 2220
 caggccatag accaccactg gctgtgaact ctctgggac ctctgtctct cacagcctt 2280
 cttggccccac ccatggcccc taggcccctgg gatcagcctg aggccccaac ccacttccag 2340
 cctttatttc cactagccct ggaaggcaac tgccttggg cttggcccc ctcatthgtt 2400
 gctgccccca gcagggtgat ctgcatcatg ctttctctga tgaccagcc atacacacc 2460
 ttgtcccaa ccaacctcac ctaccctgac cattccccct accctatatc ccagggtata 2520
 gggcctgtct gggcagggct tcaccacact ctggagctgc tgccccgcca cgccccacc 2580
 cccggtggca aagcccttcc gcccacagcc agtgccttcc cctattggct 2640
 caaggccatg tctgtcacc aggcccagcc ggtgtccag ggtgtccag tccaccctc 2700
 cattgtcttt ctctgtggt cacttgcgg ctttgagttg ggacggcacc acaggtgag 2760
 tctgtgatct cctctgcta gcatgaggtg ctccgtggcc aggtccagac ctctctgagc 2820
 ttgtgtcag tccatactca gacaggtctg ggcctacctg gccacagagt gtgtctgcca 2880
 gcgactgcat tcaacaatg aatattctga gagactgggt aggagatggg gctggctctg 2940
 accgaccaag gcccatgtgt gaggggctct tgggtccagt gaggggggcc cactcggca 3000
 ggtacacaa agggcatctg ccaggtagct ccagcctgce tgatacctgg ttggcagca 3060
 cccacagcgg cctgtggtga caagaatatg tccaccaggg ggcaaccaag gggcagccc 3120
 tgctggccac tgttggtgga ggtggtgga gaggacggag ctccagaggc aggtgtgac 3180
 cagccacagg gagaggacc caoctcagga ggagcactg tttgcttcca gagaagtgt 3240
 gcttggccct gctcacccca gaggaaatgaa ggtgtttcta gagtcagagt cctcagtga 3300
 cctggcatc ctgagatcca ggtgtttctc actccatgcc ctgtgcaata tgcacacaa 3360
 gccaaaggtg gccgcaactg tggtgttac agttgattag ttgcttcat taacataca 3420
 gatgtctggg cctagtggctc atacctgtaa tcccagcacc ttccagaggc gaggttggag 3480
 gattgctgga ggccaggagt tccagaccag cctgggcaga atagcgagac cccatcttt 3540
 agaaaaata acaacaggcc aggcgcggtg gcttgcgect ataatccag cactttggga 3600
 ggcagaggtg ggcggatcac gaggtcagga gatcgagacc agcctggcca atatggtga 3660
 agccctctc tactaaaaac agaaaaatta gctgggctg tgggcacggc cctgtagtcc 3720
 tggctactcg ggaggctgag gcaggagaat cgttgaacc caggaggtgg aggttgcagt 3780
 gagactagat cgcgctactg cactccagcc tggcgacaga gtgagactgt ctcaaaaa 3840
 gaaaaaagaa acaaaaaaac aacaggggcg ttgcacagcc cgtgcaaatg cacagaagcc 3900
 tcttgagtcc cggcgatcca gcggcccaga cttctgacat cctggagagg ctggcccacg 3960
 ttggaactg ggaggccctg agagttgagg gacgtggagc tcttgtgga gagagtgggt 4020
 gggctgagaa gacaccacca aggggcccgc gccctcgccc tccgcccgc cctcctctcg 4080
 ccgggctctg caggcgggga ggtggagagc ctgggagtcg cgtgcaaggg aggcgtccc 4140
 gtgacgcagg gccctggtgca tttctccagc ttggtcttct gacctggccc gctctgagc 4200
 tccccctaa ggcgaagaaa gcaggttctt gccgggtaa ccagagggct cggcgagag 4260
 aagcgcgcca gggacgttac tgtaaactgc gtgcgagaa accaacgggc tgggtggcgg 4320
 ggcagcgcag ccgcccggga caccggccc gacagctgga ccgtggcgca ctaggcctt 4380
 cctaaatgat tgcccggagt gactcgccga gaccccgtgt gtacacaagt gggacgaggg 4440
 gcgggcgcac agcggccagg aagtccgggc ccagcgcacc cctcagcggc ccatcccgt 4500
 ccgtggggcc ggacaggacc ccgggaccac gcgggagcga tgcaaggtcc gttcccgtc 4560
 cgcgcacttg ccgcccag ccccggcct gggagctgc acggctccca ggtgttctg 4620
 cgcgggtgag gccgcggcga ctacgactcc cagggtgtc tgcgcggcg gcccggggc 4680
 gactacgact cccagggtgc cctgcgccc gtcagcctct ccaggcccc cctcaggtcg 4740
 gcgcggact acaaatggac gagagaggcg gccgtccatt agttagcggc tccggagca 4800
 cgcagccgtt gtccttgagg ccgacgggoc tgacgcgggc ggttgaacg cgctggtgag 4860
 gcggtcacc cgggtacggc ggcggcagg gggcagtgcc gggcgttgc tagggcccgg 4920
 aggtggggcc gcgcgcctcg ggcgctacga accggcagg cccacgctg gctgocggc 4980
 ggtgcgggct gaggccatgg gcgaccgcg cagctcccgg cgcgggagga cagggtcgc 5040
 gccctcgagc cacggcggcg gcggccctgc gggggcgaa gaggaggtgc gggacgcgc 5100
 tgccggcccc gacgtgggag ccgccccgga cgcgcagoc ccggccccca acaaggacgg 5160
 agacgccggc gtgggcagcg gccactggga gctgaggtag cggagcgcct gaccccctaa 5220
 cctctgaccc aaggccccg cgaacttccg ggggtggccg aagcgcgagc tccgagtc 5280
 agaacatggg ccctgggcta agcggggatc ggtgtgcct atgggcccgt tggggaaact 5340
 gaggctggg gagagtcacc tgacaaggtc actggtagg ggtctggag ctggccttg 5400
 ccaggcagag gggagccggc aggtgtcccg catccagatc ctctgggtc tgtgcatcct 5460
 caggggctcc tgaggagctt ttcgaggggc gggctggtgg gggcccggcc ctggacagt 5520
 tcccttata tggaaaggagt cagataagat ctgggcagtt tgtggtgata ggttcttct 5580
 tgggtctatg agcgggtgct tgccggtagg aaaggtccc agaggagggc tgccctgcca 5640
 gggagggggc cagaggagcc caggcctgtc cgaggacagg ggaatcagca gctgccccgg 5700

acaaggggca gtgttagagg cgttcttgtc cttgcagacc cttctgagag tggctgcgtg 5760
gcccattcat tgctccagtg gttaggetgg cctggagccc tgccgatgtt gccagagcca 5820
gcgtctgttg tagggacaga gagttgggtt ctgtgttggg acttccatcc tccaggtggg 5880
gagtggggta tgggggtggt ggacacacct gcaggcgtgt gccctgctca gctggatgac 5940
tgacagagag ggggtggagg agagaacccat ggccgatggg aaggacttgg ccagcctggg 6000
cattggcttc ctccaccaag ctggccttga gcaatccctt tggcaccctc catccccct 6060
ttatggcctt taccctggcc caggggccc cagggccttg ttttagagag cagctgaggg 6120
cctagaggtt atcaaggcag aagtggcgtg attttggaca tgtagtggc aatgatttgc 6180
tctctcagtg agcaagaaca gagcttccct tcacggggca ccatggggag ggggttgggg 6240
gagggcagge actgtcgtgg ccctcagggt gctcagttca tetgggagat aagataacct 6300
cagcaagagt caggcatgga gcaacatgga caaaggtcgg gcacggaggc cctgaagggg 6360
ccgtggggag gaggggtggc ctccctgagag ggggtccttc ctgctgtggg ctgggggtgc 6420
tggtgagggg ggctggccta ggcacctcct acctgaaaag gaggtgtggc tcctggagtt 6480
accctctctc caggaggcag ggggatggct acatgacctg tggaggacgt ggggaattgag 6540
atctcttttt tttctttttc tttttttttg agactagttt tgctcttgtt gcccaggtg 6600
gagtaaaatg gcacattctt ggctcactgc aaacctgtcc tcccagttc aagtattct 6660
cctgcctcag cctccagagt agctgggatt agagggccc accacacccc gctaatattt 6720
tatttttagt aaagatgggg tttctccatg ttggtcaggc tggctccgaa ctctgtaact 6780
caggtgatcc acctgccttg gcctcccaa gtgctgggat tacaggtgtg agccaccgag 6840
cccggccggg aattgagatt ttttttagtg tgagatgagg gtagtccag ctttgggcca 6900
agccgccacc tgggggtagg caggggagag cagtcacctt cttgctttgc aaaccagcaa 6960
ggcttccctg tacttctgct ggtgtgggat ggggtcagag ctcgtgggag aggcctgggt 7020
agtccctgtc cctgcctgtg aggtcgggtc tccttgggaa gagggcagt agatggagag 7080
gtgagggcct catgggctg gaggtgaga ccaaaagtct atctgctcct gggctccag 7140
gacttgcaag ctatgtgtgc ttgtccctca gacctagga tgcagcaggg ctccggccact 7200
ggctgtggac actgggctct tetccctgct gtctgcgtca ggccttgcct tgcctgcct 7260
cctgggaactt ggcctctagc gcacccctt gtcagcctca cagcctccc tccctccagc 7320
ttcctgctgc tcttggcca gccagcctt tccttcccag cttcctcatt actccttgag 7380
ctcgggccc cccccctc ggacacttcc tgctcaccta gggctgggct ctgggtgtga 7440
gctcctttct tccggcccag tggcaagtg aggtgtgag gcaggcagga gcaggcacc 7500
ctttctgctc tgcttgtggc tcactcctgc caggctcttt gcacacacce accagccctc 7560
tgctcacagg caccocagt cggggccatcc ggtttctggc ttctcccagg gtgttttgc 7620
cctgaggtgt cctttotaac tctcccttcc tctctccagc aggtctgag aggtgcaggg 7680
agcctgcccc aaccatcttg aaccagggcc cagcccagag gccagaagtgg agggggcggc 7740
agtgagcaga gctggaactc gcccctcctt cattgtgctt ggcctggag ctgcaactgtg 7800
tgggcccaca gtgtggact cactgggacc tgtgcctttg ggcacacttt gaacctggag 7860
acagggtggc ggggtggcat gtgccaaggt cctcagtttg ccgtgagact gagaggatcc 7920
tgctggctgg gtggcctgg gggctgcagg agggagggca ggtgctccg agtcttcttg 7980
gactagggag tgggtgtagg gacagctgga aggtgcagag gcttgggcag atcctccagt 8040
cagtgagagg gtgataaagg tgctttaggc acaggggcag atcccacctc cccatgccgt 8100
tccatgcagc ctgcctgta gccacatgc tgctggccgc actgactgct tggagctctg 8160
tgggactggg tggactgggg cttcctcctc atggggcct gtgagggga ggggtagcgc 8220
agtgggggtg ctgcctctgg gtgggctgg tcaggcctgt gaagggcctg aggtgaggct 8280
gtgctgggtg tgaggaaggc cttggaagcc tgcacaaggg cgactcctgt tttcatcttg 8340
ggattgtctg cagtgaactt tgggaagcac cacccttcc cgactcctgt tttcatcttg 8400
gagatgggca tggataaagg cagcatggtg tcocttggtg ctcaaagggg gcaggggtca 8460
tactgctgtg aaacagctgt ggttggtagg tcgtggtaga agaagggcaa ccctgaggct 8520
tgggattgtt ctgotgaaa caaatgggct cgaacttggg gaagaggggg cagtggagag 8580
gccccagac agacagccca gagaggctgc tgggcagttg ggcctcgtgc cctgctccc 8640
gtcacgggtc tggggctctg gcggtgcta ccccagcct cctggttgtg ggcaggcagt 8700
gagtgagta ggtggggag atgagccaag ggcggtggtc agttgggaag acagctgcca 8760
acttggggag gagggaggct ctggtggaga ccacagcctc actgcatggc ccaggatgga 8820
cctggtgggt ggatgcaggg cgctcaggct ggagctggga gaggcagggg ctgggtggag 8880
ctgectgccc ctgtgttcca gtctagatgg gcagagggaa aggtgtgagc atcctccctg 8940
cctgggggtc ttgggacta gtgtagactt gtcagggaac tgtgtagggt tagatggggc 9000
atgtgttga ccaaccttgg tcttggggag caaaggttgg gcttgttggc attgctctc 9060
ggcctcctg gccctttgccc tccctggcag ggcctctga etgcccagcc caatcctagc 9120
cagcttgccc tgggtgccct gaggcgtct gcctcatggg gctcctgcca tggctctcag 9180
gcccactctc cctgcctagg ggctctgagg ggcagatgtg cgtgtgcggg agggaaaggg 9240
aggctctggc ctctcctctt acaaagtga ggacttgctc aatgctgtgt gtggtgtccc 9300
agtggcacgg cagatggggg gtgaggggg cctgcagcta gtgtatatga gccagcactg 9360
cttctagga cgtgtggggg cctggccaag ctcttctgt ccttgtccta actaatggc 9420
agtccctcta ttgggctggg tgcctcttc caectgtgca gtatgctgag gaccagggag 9480
ggtctgectg tgcccccca gcgctggtt ggagatcatg ggtgggtgcc tgcctctgtt 9540
ggaagcctc cagccagcag gcacctagcc cgggtgggt tectttcagc cccctcagcc 9600

tgggcacaca	tcacaaacaa	gtggaggcta	cactggcaca	cgagggctgg	atccctgect	9660
ctgggaaagt	gcatgtcagg	ctggtgtgtg	gctgggeect	ggcctgcott	tgccagtttg	9720
agcctgcacg	tccaagtgtg	gggacccctt	agtcccgggg	tgctgggatg	ggccaactga	9780
atatggtgga	ctcaaccctc	accacttggf	ccccacagtg	ctgggcagtg	ccccctggtc	9840
catccccagg	ttggaccctg	cttgtggccc	cagtgtctagt	ccacagccag	agtacatggc	9900
agtggccaga	ggcctctgga	gagtgaggcc	tgagtgtecc	aagctccatg	taggtccagt	9960
ccgggcaggg	ccagctgggc	ttgcttctga	ccctgacatg	ctcgtcccg	tgccctggagg	10020
tgaggctct	gggggtccgg	agagctttgc	ccactgtagg	tcttgaggcc	acagtgtggc	10080
tctgectgge	ttctcctcct	ggttghtaaat	aaggagtggg	gcctgagggc	agacgaggac	10140
actgggggtg	ggcctggat	cctgcccggg	tgccgctgoc	ctgctggtgc	ccactcaggg	10200
ggtgcttgtg	ttgtgctctg	tcaggtgcca	tcgctgcag	gattctttat	tcagctctga	10260
cagtggcttc	agcaactacc	gtggcatcct	gaactgggtg	gtggtgatgc	tggtgagtgg	10320
gacatggtgt	cgggagccgg	tetaggcca	ggtggggctc	tgteccaggc	tgccctttgc	10380
ctgagaacag	gctctgtcac	ccaggtgtc	caggctggag	cccctgtggg	ctggggtgtg	10440
tggaagcagg	tgcaacctca	tggtgctgcc	agcactggac	tggtggggag	tggtggggca	10500
gtggctgccc	ctgctgtggt	cacttgggtg	cccactgcacc	acatacttgc	tgcttcccat	10560
tggatcccag	gaaaacctg	ctgatgtggt	gtgggctgg	ggacgccgaa	caatgectgg	10620
ctggaacctg	tgtgttgtga	gctgggectg	aggggtgcag	ggcctccagg	gagggcaggg	10680
tggagggggg	cttgccctgg	gctggtggga	gagtggactg	catgctctgt	ggacacaagg	10740
cctctctggc	aggggatgtg	agaagagctt	cctgtgctac	gccacatggc	ctctgtgggt	10800
atggagccct	gcaggcctgg	ccaccactct	gcagtcctcc	tgccccttc	ctcagctgtg	10860
gggtcctagg	agccccccag	gaaagtgatt	agatggagcc	ctgtgccacg	tccaaggcct	10920
gctacctctg	ggcctggttc	ccactgnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	10980
nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	nnnnnnnnnn	11040
nnnnnnaccc	cagaagtagt	tggagttag	ggctcaaagg	ggcacctgca	gggcaggtcg	11100
gggacaaggg	ctatctgggc	ccagcctccc	caactcaggg	ctgatgtggc	tcgagggcct	11160
tgacctcac	ccaggcgtgt	ctatctctgg	ccttgggtgc	tgctcctgtg	gctaccacag	11220
tggaaagggc	tccacgcaca	tccacatccc	ccaaccgcca	tggtcctaga	aggttccctg	11280
gggggtggcca	gctgtggagg	cccacgagtc	ctggtggctg	agaagctggc	caggcaggag	11340
gacagtgggc	ccagcggccag	cccagcactc	aggagacgca	gcccattcct	ggcccaggtt	11400
gggccttctc	cagcccaggc	agcactgtgt	attctcccca	acccttggg	cctgcctggc	11460
cctttggccc	atcactgaag	ccttttccct	gctttggctc	ccccttgccc	ccaccccagg	11520
catgtatccc	gctctgggct	gcttgttgea	ttccttctgt	ggcctgggoc	tggaggtggg	11580
taccatccat	tgccaacttt	ggcttctgcc	tgctgtcaac	cctcaggaga	agccagtggc	11640
agtgtgggoc	acgtgtccat	gcagaaggcc	tgtgtgtcag	ccctgcggcc	gggggaggcg	11700
gggcagttag	ccttgtgtct	ctgaagcagt	cttctctctc	atgaagcctt	ccctgaccac	11760
ccaggcaaga	caccctcagt	gttcccttgc	cagcgacct	tttcccacgc	accagttcac	11820
taccgcatga	ggcccagact	ccgggtggtc	agccaggtct	goggcattgg	ggcccagctt	11880
aatggaggtg	ttggtagtgc	ttgtaagatg	gaggaggagg	ttcctgtcct	tcgagaggga	11940
ggccaagcac	ccaactccag	gctcgtccca	agagccttat	tcctggggg	tcagctcctg	12000
ggaagtgtct	ttggagccaa	gtgtccaagg	cttagagggc	ggcagggaag	agaagactga	12060
ggcggggcac	aagccctggg	aagcactcca	ggcccagccc	cccttgcgac	acagctggac	12120
actgctcctg	cagagaaaga	gtagacaact	cccctcttc	agccttggcc	accagtaggg	12180
actggttccct	tggggctcag	ccgtgggcag	gcctccctgg	gcaggcctgt	attctggggc	12240
tgtctctggg	gtgtggttgg	ctgtgggagc	cttgggtccc	tcactggctc	ggctcagcag	12300
gaggtatgtg	agcagatcag	cagctggtct	ttctgctcct	gaagaccag	ggtctggca	12360
gggtggttgg	gtctggccgg	ttggttccct	ccatgtggga	ccgtctggtg	tgctggggac	12420
agggaggggc	ttccccttac	ccagcactgg	tggtggctga	ggtgggtgct	gagtctcaga	12480
gcttggcatg	gagaccagac	agggctgggt	ctgcaagcct	gaggctgccc	ccctgagctc	12540
gggctgggac	gtgcccagag	gtgttgggag	gatctggggt	gagtaccctg	tggccaggac	12600
taaaggggct	gcaccctcct	gtccatccct	ogcagatcct	gagcaatgcc	cggttatttc	12660
tggagaacct	catcaagtga	gtgcctttgc	caggtcccac	ccctgcccc	cccattggct	12720
gtccaggccc	cgccccacag	ccccacctgc	cacccaatca	gacccccatc	ctccacccc	12780
caggtatggc	atcctggtgg	accccccca	ggtggtttct	ctgttccctga	aggatcccta	12840
tagctggccc	gccccatgce	tggttattgg	tgagctgggc	tctgaggagg	gcctcgggtg	12900
gggatcaggg	tgacgtggcc	ctaaacctgc	cccttgggtg	ttctgtccac	agcggccaat	12960
gtctttgctg	tggctgcatt	ccaggttgag	aagcgcctgg	cggtggttaag	cagtccctct	13020
cacctccgtg	tgtgetcacc	ctgctgtgtg	cgctcctggg	aggagctgct	ccccagggct	13080
ggcagccctc	tcccaggcaa	tgggagccct	ggttgagtgc	tctgctcccc	actccaggg	13140
gccctgacgg	agcaggcggg	actgctgctg	ccagtgccca	acctggccac	cattctgtgt	13200
ttcccagcgg	ctgtggtctt	actggttgag	tctatcactc	caggtgcgcc	cccatcccac	13260
cctgcccac	tgtctcgggc	cagccaoggg	catggcctcc	ggctgtggcg	ctgtggaggc	13320
ctgagtccac	ctctcctgca	gtgggtccc	tgtggcctct	gatggcgcac	accatcctct	13380
tectcaagct	cttctcctac	cgcgacgtca	actcatggtg	ccgcagggcc	agggccaagg	13440
ctggtgaggg	gctgccaggg	gctggggctg	cctgctgggg	ggctgggag	cagcagggcc	13500

ccaccagccc cctcccactc tgctgtgctc gtagcctctg cagggaaгаа ggcacgcagt 13560
getgctgccc cgcacaccgt gagctaccog gacaactctga cctaccgcgg tgaggacctc 13620
tgtgggcctg aggtgcccgg gacaggtctg gctctgtctg gtaccaacc cccattccca 13680
ttccagatct ctactacttc ctcttcgccc ccacctgtg ctacgagctc aactttcccc 13740
getctccccg catccggaag cgctttctgc tggacggat ccttgagatg gtgaggttg 13800
gggetggggg cagccactgg aggetagggg gccttctggc tagccagggc ctcagctggc 13860
tgetctctgt tccccccca gctgttcttc acccagctcc aggtggggct gatccagcag 13920
gtaagtgggg tagggcaggg ttgggtgtag ctgggcatgg ctgggagctg acgtgggtcc 13980
ctcctttgca gtggatggtc cccaccatcc agaactccat gaagcccttc aaggtgagtg 14040
gctcaggtgc tottgcagct ggggtggctg gggagtgacc aggagcatgg ctagctgaag 14100
ggcttgtttc tgcaggacat ggactactca cgcacatcg agcgcctcct gaagctggcg 14160
gtgagtgcgg acaggtggcg catgcacagg acaggagggg acagtggcat gtgggggaa 14220
gttctagAAC ttggtgccc cccccacctc cctgccaggt ccccaatcac ctcatctggc 14280
tcatctcttt ctactggctc ttcactcct gectgaatgc cgtggtgag ctcatgcagt 14340
ttgagagccg ggagttctac cgggactggt cctggggtgc cctgggggt 14400
tgggatgggc catggtgtgc tctgatcccc ctgtggtctc ttggcccccа ggaactccga 14460
gtctgtcacc tactttctggc agaactggaa catccctgtg cacaagtgg 14520
ggtggggtgt gtgtgtgtgt gatgtggaac atggtgtga acctgaaccg ctttccatgc 14580
cccctcctct gcagacactt ctacaagccc atgcttcgac ggggcagcag caagtggatg 14640
gccaggacag ggtgttctct ggectcggcc ttottccacg aggtcagtg 14700
atcttgctc atccctgggc aggggtatgc ccacagcagg gacggctgac accccactcc 14760
ctggcctct ctctccctcc catctcagta cctggtgagc gtcctctgc gaatgttccg 14820
cctctgggcg ttcaaggcca tgatggtca ggtgagtgac cccacgtgg cctcctcact 14880
cgcccagtta ccccgacct gaaccctctg gctgacctc cccatgcccа gggacctga 14940
agccccagc cctgtggtca ccatggccga ctgacttggc cctcactcc ctatgcccа 15000
ctggcctggt tegtgggccc aatagccctc ggaactatg gcaacgcagc tgtgtggctc 15060
tegtcatca tccgacagcc ctagctgac ctcatgctc tccacgacta ctactgctc 15120
aactatgagg cccagcggc agaggcctga gctgcacctg agggcctggc ttctcactgc 15180
caectcacac ccgctgccag agcccacctc tctcctagg cctcagtg 15240
cctggtgca cagcatctc ctctggtccc agggaggcct ctctgcccct atggggctct 15300
gtcctgcacc cctcagggat ggccagacac ggcagacac agtctgatgc cagctgggag 15360
tcttctgac cctgccccgg gtccgaggg 15420
agcctgccag gggcctgggg cctggtgggg ggtatggcca caccacaag ggcagtgcc 15480
agagctgtgt ggcagctgt cccaggacct ggcggggagc agcagctcca ctgcagcag 15540
gaggatgg gcggtagggg gagtcaagg ccaggcagac gcccccttc cccacactcc 15600
cctacctaga aaagctcagc tcaggcgtcc tctcctggtg ctactcctgc tgggtgtg 15660
ggaatcggca ctctggccct cagtgcagga tggtcaactt gcaccaccg tgctcagctt 15720
cagcttggga agaggtcggc cctggtttg cgggaagtgg gctccagcca ggatggcca 15780
gggatgggca gtccacaggg cctttctggt gtgggtctgg tgagccgagg ggtaccggt 15840
cacaatggt atgtccatgg ctattcgct tggggcaggg ctcggtttgg cagcctcttt 15900
ccttacttg gaacctggc agccaggtgg gctggtggt ctcagctgcc ctccacgagg 15960
ttggggcacc cctgatcccc aggcctgct tgcctctac tcttctggca ccaggctggg 16020
cagtgcagac agcgcagccc tgcagccttc aggacacctt gttcccaggc cctgcaatcc 16080
accaagctgg atagatggg ccccccttga tggtagcggg aggtcagggg taaccaccag 16140
gcctgctgc tgccttacct tgcctgagta actgcttgat taaagacccc aagactggac 16200
caggccctgg tgtcccaga cctgcagctc tggcccaaca aggcaggtgt ttgaggaggc 16260
cctgcacagg gtcaccagg gectcatcag caacctgtg aactcgtg 16320
gtgaggggag ggtgggctcc cttggtggt tctcctctc accccagtg 16380
gcctgagat ggaggcatct ccttgggccc tgctgaggat ggcagtagt 16440
tgggtggggg atgggtgtgg ggccgactcc tccatcccac atgggtcct 16500
ctatcagttg gccagtgagg ctcgagaaca aactgttgc gccagataaa gcagcaage 16560
ctgctccact gcccagcgca ggccccctc ccttctcca ccaggctgag tggagaacce 16620
taaagctacg ggacaggtc ccgttcccc tgcctacaca ggtgctggc tctggcagaa 16680
agacagtgt cccgccccgc atcactgtc cgagtgcgaa caccttggga aggggttcc 16740
tgggtggtcct gtgacaacca gagaccccca gggccaagg 16800
ctcaataaag aactgcaagc acatgctggt cctggggagt cgggcaggca ccccttctgt 16860
tgcaagcatc cgtcttcccc caggaggcca ctgcagcccg gcccttctgt gccctgggcc 16920
cctcctcatt gcagaccac ccaccgcacc accctgggac agaggaaca catggaggcc 16980
atagataga gectgtctgt ttatagatct gtcctgtct gaacgggaca tgcctgtc 17040
gtatatact gtgtatctct gttgagcggg cagtcagggt gttgctgtga agcccaacc 17100
acaattctga ctatgaacaa cctgcagggt gggggaagg agactggcag gccagggtga cctcctgac 17160
aaaccacagg acacggggtt gggggaagg gtcctactgg ggtatggcg gccagcccac 17220
cagaggtgct gccagacc cagcccgtt gagcccgtt gtcctactgg ggtatggcg gccagcccac 17280
cagtgcccaa gaccgcagg ctgccctgcc tcccacagac cagccctgca ctgggggtgg 17340
gggtggcg ctggcccag cctctaggag acagtgggt ccttggctt 17400

gggaggctcc gagcctgtca gcagggagat ggtggggctcc tggcgaagc cgtccccttc 17460
 ggagaagttag gagccctctc ccagctcaaa cagcaccggc aggtcgttgc tccccgtgtc 17520
 cacggagccg gggccagca ggaacagcgg ctgcgctgtg tagtgcacca gctgctccc 17580
 tgcgggggtg ggggtgtcaa ggcgggtggg ggttgggggc agaggtgggg ccggtgggac 17640
 ttggctcacc tgaatccggg ctgctgttct ctgectcggg aggcctgggg ggctcctggg 17700
 gagacaggag ctcttgatc tgtggggtgg agacggatt gtgagcactc ccgctggctc 17760
 cgttccccct cccccccgc ccgectacgc aactggcca ggctgctgtc aaggtcaggc 17820
 aggctcatgt cgggcacggc caccgagggg ctgaacagct gcggaggagg gagggagtc 17880
 agaacagcac ccgggggccc ggcgggggaa cggggaggcg gggaggcggc gcggggaggc 17940
 ggggaggcgg cgcggggagg cggggaggcg gcgcggggag gcggggaggc ggcgcgggga 18000
 ggcggggagg cggggaagcg cggggaggcg gggcggggag gcggggcggc ggggctccc 18060
 tcacgtccag cagggcactg gtgtccacgc tgaagccgtg gctgctcagc atggtctgca 18120
 ggttatccag gttggagtcc atagcatcca agtggctact gagctcattc cccgccggg 18180
 ataaggcggc acctgaacca gtgccccagg cccacacacc caatgccctc ctgtgggaga 18240
 agggctcccc ttgactgtac cccccaggc gcacccccgt gtacgcctgc acaggctgga 18300
 gggggcagcg cattcgagga cggcctgga ggcagtggag gctctgtgcc ctgcaggggt 18360
 gcggctgggc ctatgatggg catccctttg ccatgagggc ctgggggccc tgggtggcagt 18420
 ggaccagga gacaaggggc gtattcagct ccagcacaag gatcagggat ttcagtgttc 18480
 agggttggtg aggtttccc ttgcaactggg aaaacagggtg gggctctgct cagtgtgtgg 18540
 gtggtcagt ccctgccctg gtgctgctgt ggggatgaga cccacggctc ggtggtctg 18600
 accaagaaag ccctaggcca cagggcacac ctgggctatg ggacggacag ccaggctggg 18660
 tcccagaggt gccctggaga ccctgcctga caggaagtgc agtcagcacc gcagtctgga 18720
 tccgtccaac accagaggcc gtgccaagc agggaggcct actcctgtca tccctgtcac 18780
 aggcaatgac cacaggcccg tggccagggg agccatgacg aactgagcc cccgccacag 18840
 aggggtctcg gctgctgccg cccaggcccg acgctcatgc ccggccaggc tgggtctggt 18900
 ccacggctgt gtgggagggc ccgagcctg gcagagccct cctccctccc cagtggggtc 18960
 agcgtctaac ctggctggac ttggccatgc ggagaggaag aggggcaggg gaagaggcgg 19020
 gcgaccctag acatctgtgg agtgcgagcc aaactgcaag atacaaaaac aagagcccc 19080
 attgcaggca ggggctgggg gtgtggaggc cggccctgct caccatctcc tggcatgtgt 19140
 ctgggcagca cgacctgcca gggcccgtgg cctgtggcga ggggtggcggc agcaggaggg 19200
 gtggtgaga gcagggcccg gcagcctgtc cggacatgce cgtggcttct gtggcgtttg 19260
 ggactgtggg gtgatctggc tggcacctgt ctccctccc agccccgagc tccgaggttg 19320
 ggggtagggt cctgcctcgc cagctgccct gctcagcca ctgggacagt cggggctgaa 19380
 gccagggct gtgctccag gcgctgtggg tggggccagg ggtggcggc actcacttgt 19440
 ccaggcaggc taccctgaag cacttttcat ggggtggagg gggcgggggg gaaggaagcc 19500
 ggcctcgggt gtccgtgtgg cccctggcgt ccgtgagggc tgtgacggag gcgggggag 19560
 gttcactctc ccgcaggatg gagtcaatga gggcggctcg ggacaagagg gtgtccacgg 19620
 aagatgggcg cccgggactc gcctcctcta cccgggggct ctgaggcggg ctggggggct 19680
 cctcctgac acgcaccagg gggctgctgg ataggggccc gcacacgagg ggggcccagg 19740
 gagctggcgt ctggccagc cccacctcat ccccaactct gccctgggce cacaggggct 19800
 cgctcattg ggggacagga tggctggggg gatgcccggc ccacctctcg tctatgctcc 19860
 cgcgggggga ggcctatggg ctggcaggag ccagctcggg gatgtcggg atgatgggtc 19920
 cagagctggc caccagatca gggcgtaga gctggagct gctgtaggct ggggaggggg 19980
 cctgcaatca aaggcaggag gtccatgcag tgcccggcagg ggcaaccac cccactgccg 20040
 cctgcatgcc tgggcccggg ccctgtctcc ggcactcacc gagtaggggc ccgagccgtg 20100
 gacgtgctcc agggagaact gccggctata cttgggcatg gaatgtgctg agccactgtc 20160
 gttcagcatc agggggctgt ggggaagggt gcaggtcagc caccaccccc cacctcgggg 20220
 taccggggc acagctgaca gagaaggggg acagccctgg gccccgggtg gtggatgcag 20280
 gcatcccaa aacctcacat ctttctcttc acccccaggga tccggtttga ctgcaccagt 20340
 gagatcagga actgaatgag ctgtggagag agaggacaca gttacccccg cccttgtggg 20400
 gccccggcg gccctctggc cctgccccca ccttgttgac gaatttctgt tgetgggcat 20460
 gcttctgccc aaggctggcc acctcccgc acagagcctc attctcactg caacagacca 20520
 ggctgtccca gtggggccc atcccagag ccccaggctc gagggagccc cacagaccct 20580
 ccctgtcccc catgcaggag caggggtaag tgtgaccatg tctggcctgg cccaccccag 20640
 gatgagaact tgtgtgtgga gggactgggg gccagggcca gggcttgtctg gtcccactgc 20700
 ccctccctgc cggggacacc tgggtgtcac taggggtgtg gggatggatc catgcgagcc 20760
 aggtgcaccc ggatcctggc atccatcctg gcaaacacct ggagggctgc cttggacaca 20820
 ggccaggagc agacccttg gccgcccttc caaggcctga gcagccaggg taaggaggga 20880
 cggtcttca ggctgcgaca ctggtgtccc catgtcctgt aggtgctcag ggcctcggc 20940
 aggcctggag gtggctcagg ggtggggaag agctgtcccc agccagggtg gcagggccat 21000
 g 21001

<210> 4
 <211> 1976
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

```

gaatggacga gagaggcggc cgtccattag ttagcggctc cggagcaacg cagccgttgt 60
ccttgaggcc gacgggcctg acgcgggcgg gttgaacgcg ctggtgaggc ggtcaccogg 120
gctacggcgg ccggcagggg gcagtggcgg ccgttgtcta gggcccggag gtggggccgc 180
gcgcctcggg cgctacgaac ccggcagggc cacgcttggc tgcggccggg tgcgggctga 240
ggccatgggc gaccgcggca gctcccggcg ccggaggaca gggtcgcggc cctcgagcca 300
cggcggcggc gggcctgcgg cggcgggaaga agaggtgccg gacgccgctg cgggccccga 360
cgtgggagcc gcgggggacg cggcagcccc ggcccccaac aaggacggag acgccggcgt 420
gggcagcggc cactgggagc tgaggtgcca tcgcctgcag gattctttat tcagctctga 480
cagtggcttc agcaactacc gtggcatcct gaactggtgt gtggtgatgc tgatcttgag 540
caatgcccgg ttatttctgg agaacctacc caagtatggc atcctggtgg accccatcca 600
ggtggtttct ctgttctga aggatcccc taactggccc gccccatgcc tggttattgc 660
ggccaatgtc tttgctgtgg ctgcattcca ggttgagaag cgccctggcg tgggtgccct 720
gacggagcag gcgggactgc tgetgcacgt agccaacctg gccaccattc tgtgtttccc 780
agcggctgtg gtcttactgg ttgagtatat cactccagtg ggctccctgc tggcctgat 840
ggcgcacacc atcctcttcc tcaagctctt ctccaccgc gacgtcaact catggtgccg 900
cagggccagg gccaaaggct cctctgcagg gaagaaggcc agcagtgctg ctgccccgca 960
caccgtgagc taccgggaca atctgacctc ccgcgatctc tactacttcc tcttcgcccc 1020
cacctgtgc tacgagctca actttccccg ctctccccgc atccggaage gctttctgct 1080
gcgacggatc cttgagatgc tgttcttcac ccagctccag gtggggctga tccagcagtg 1140
gatggtcccc accatccaga actccatgaa gcccttcaag gacatggact actcacgcat 1200
catgagcgc ctectgaagc tggcggctcc caatcacctc atctggtca tcttcttcta 1260
ctggctcttc cactcctgcc tgaatgccgt ggctgagctc atgcagtttg gagaccggga 1320
gtctaccggg gactggtgga actccgagtc tgtcacctac ttctggcaga actggaacat 1380
ccctgtgcac aagtgggtgca tcagacactt ctacaagccc atgcttcgac ggggcagcag 1440
caagtggatg gccaggacag ggggtgttct ggctcggct ttcttccacg agtacctggt 1500
gagcgtccct ctgcgaatgt tccgcctctg ggctttcacg ggcatgatgg ctcagatccc 1560
actggcctgg ttcgtgggccc gctttttcca gggcaactat ggcaacgcag ctgtgtggct 1620
gtcgtcatc atcggacagc caatagccgt cctcatgtac gtccacgact actacgtgct 1680
caactatgag gccccagcgg cagaggcctg agctgcacct gagggcctgg cttctcactg 1740
ccacctcaa cccgctgcca gagcccacct ctctcctag gcctcgagtg ctggggatgg 1800
gcctggctgc acagcatcct cctctggtcc cagggaggcc tctctgccct atggggctct 1860
gtcctgcacc cctcagggat ggcgacagca ggccagacac agtctgatgc cagctgggag 1920
tcttgctgac cctgccccgg gtccgagggc gtcaataaag tgctgtccag tgggag 1976
    
```

10 <210> 5
 <211> 170
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 5

```

cgctcaggt cggccgcgga ctacaaatgg acgagagagg cggccgtcca ttagttagcg 60
gctccggagc aacgcagccg ttgtccttga gggcgacggg cctgacgcgg gcgggttga 120
cgcgtggtg aggcggtcac ccgggctacg gcggccggca gggggcagtg 170
    
```

20 <210> 6
 <211> 913
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 913
 <223> n = A, T, C o G

<400> 6

gcttggetgc ggccgggtgc gggctgaggc catggggcagc cgcggcagct cccggcgccc 60
 gaggacaggg tgcgggccct cgagccacgg cggcggcggg cctgcggcgg cggaagagga 120
 ggtgcggggac gccgctgctg gccccgacgt gggagccggc ggggacggc cagccccggc 180
 ccccaacaag gacgggagcg ccggcgtggg cagcggccac tgggagctga ggtgccatcg 240
 cctgcaggat tctttattca gctctgacag tggcttcagc aactaccgtg gcatcctgaa 300
 ctggtgtgtg gtgatgctgg tatggcatcc tgggtggacce catccaggtg gtttctctgt 360
 tcctgaagga tccctatagc tggcccggcc catgcctggg tattgcggcc aatgtctttg 420

ctgtggctgc attccaggtt gagaagcgcc tggcgggtgg tgcctgacg gagcaggcgg 480
 gactgctgct gcacgtggcc aacctggcca ccattctgtg tttcccagcg gctgtggtct 540
 tactggttga gtctatcact ccagggggcg ccccatccca ccctgcccat ctgtctcggg 600
 ccagccacgg gcatggcctc cggctgtggc gctgtggagg gctgagtcca cctctcctgc 660
 agtgggctcc ctggtggcgc tgatggggca caccatcctc ttcccaagc tcttcttcta 720
 ccgcgacgtc aactcctggg ggccccaggg cccaggccca aggttgccctc tggcagggaa 780
 aaagggccag cagtggctgc ctggcccgca acccggggga ggtaccccgg accaatttgg 840
 acctcccgcg gatctccaag aacttcccgc cttgcgcccc cccctggggg ggtagcgagc 900
 ttaacttttt gcn 913

<210> 7
 <211> 1650
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400> 7

ggatgaatgg aaataagtag aattagcat acttaggata gggctcaagc cgcggcccgt 60
 gaagattggg ccgcgacgag gtgcggggcc aagccatggg cgaccgcgga ggcgcgggaa 120
 gctctcggcg tcggaggacc ggctcgcggg tttccgtcca ggggtgtagt gggcccagg 180
 tagaagagga cgaggtgcga gacgcggctg tgagccccga cttggggccc gggggtgacg 240
 cgccggctcc ggctccggct ccagcccata cccgggacaa agacggggcg accagcgtgg 300
 gcgacggcta ctgggatctg aggtgccatc gtctgcaaga ttctttgttc agctcagaca 360
 gtggtttcag caattatcgt ggtatcctga attggtgtgt ggtgatgctg atcctgagta 420
 atgcaaggtt atttttagag aacctatca agtatggcat cctggtggat cctatccagg 480
 tgggtgtctc gtttttgaag gaccctaca gctggcctgc cccatgctg attattgcat 540
 ccaatatttt tgttggct gcatttcaga ttgagaagcg cctggcagtg ggtgccctga 600
 cagagcagat ggggctgctg ctacatgtgg ttaacctggc cacaatcatt tgcttcccag 660
 cagctgtggc cttactgggt gagtctatca ctccagtggg ttccgtgttt gctctggcat 720
 catactccat catgttcctc aagctttatt cctaccggga tgtcaacctg tgggtccgccc 780
 agcgaagggg caaggccaaa gctgtctcta caggaagaa ggtcagtggt gctgctgccc 840
 agcaagctgt gagctatcca gacaacctga cctaccgaga tctctattac ttcattctttg 900
 ctctacttt gtgttatgaa ctcaaotttc ctcggtcccc ccgaatacga aagcgtttc 960
 tgctacgacg agttcttgag atgctctttt ttaccagct tcaagtgggg ctgatccaac 1020
 agtggatggg ccctactatc cagaactcca tgaagccct caaggatatg gactattcac 1080
 ggatcattga gcgtctcta aagctggcg tccccacca tctgatctgg cttatctct 1140
 tctattgggt tttccactcc tgtctcaatg ctgtggcaga gcttctgcag tttggagacc 1200
 gcgagttcta cagagattgg tggaaatgct agtctgtcac ctacttttgg cagaactgga 1260
 atatccccgt gcacaagtgg tgcacagac acttctacaa gcctatgctc agacatggca 1320
 gcagcaaatg ggtggccagg acaggagtat ttttgacctc agccttcttc catgagtacc 1380
 tagtgagcgt tcccctgcgg atgttccgcc tctgggcatt cacagccatg atggctcagg 1440
 tcccactggc ctggattgtg ggccgattct tccaagggaa ctatggcaat gcagctgtgt 1500
 gggtgacact catcattggg caaccgggtg ctgtgctcat gtatgtccac gactactacg 1560
 tgctcaacta cgatgcccc a gtgggggtat gagctactgc caaaggccag ccctccctaa 1620
 cctgggcctg gagttctgga ggggttccctg 1650

10

<210> 8
 <211> 490
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15

<400> 8

ES 2 397 661 T3

```

gtatTTTTga cctcagcctt ctccatgag tacctagtga gcggtcccoct gcggatgttc 60
cgcoctcggg cattccagcc atgatggctc aggtcccoact ggcoctggatt gtgggcccga 120
tcttccaagg gaactatggc aatgcagctg tgtgggtgac actcatcatt gggcaaccgg 180
tggctgtgct catgtatgtc cacgactact acgtgctcaa ctacgatgcc ccagtggggg 240
tttgagctac tgccaaaggc cagccctccc taacctgggc ctggagttct ggaggggttc 300
ctggctgcoct gcacactcct cctagtttgg gaggcctctc tgcccctatg gggcctactc 360
ctgctcttgg ggatggcatt tgaatctcag cactggtatg agccagtgtc gggagtctgt 420
gttgtccagg ggctgagggg atcaataaag tgctgtctaa acccttaaaa aaaaaaaaaa 480
aaaaaaaaaa                                     .                aaaaaaaaaa 490
    
```

5 <210> 9
 <211> 1776
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 9

```

agcacgactg ggccgcgacg aggtgcgggc cgaagccatg ggcgaccgcg gaggcgcggg 60
aagctctcgg cgtcggagga ccggctcgcg ggttccgctc cagggtggtg gtgggcccga 120
ggtagaagag gacgaggtgc gagacgcggc tgtgagcccc gacttggggc ccgggggtga 180
cgcgcgggct ccggctccgg ctccagccca taccggggac aaagacgggc ggaccagcgt 240
gggcgacggc tactgggatc tgaggtgcca tcgtctgcaa gattctttgt tcagctcaga 300
cagtggtttc agcaattatc gtggtatcct gaattggtgt gtggtgatgc tgatcctgag 360
taatgcaagg ttatTTTTag agaaccttat caagtatggc atcctggtgg atcctatcca 420
ggtggtgtct ctgtttctga aggaccoceta cagctggcct gcccctatgc tgattattgc 480
atccaatatt tttggtgtgg ctgcatttca gattgagaag cgcctggcag tgggtgccct 540
gacagagcag atggggctgc tgctacatgt ggttaacctg gccacaatca tctgcttccc 600
agcagctgtg gccttactgg ttgagtctat cactccagtg ggttccgtgt ttgctctggc 660
atcatactcc atcatgttcc tcaagcttta tctctaccgg gatgtcaacc tgtggtgccg 720
ccagcgaagg gtcaaggcca aagctgtctc tacaggggag aaggtcagtg gggctgctgc 780
ccagcaagct gtgagctatc cagacaacct gacctaccga gatctctatt acttcatctt 840
tgctcctact ttgtgttatg aactcaactt tcctcggctc cccogaatac gaaagcgtt 900
tctgctacga cgagttcttg agatgctctt ttttaccag ctccaagtgg ggctgatcca 960
acagtgatg gtccctacta tccagaactc catgaagccc ttcaaggata tggactattc 1020
acggatcatt gagegtctct taaagctggc ggtccccaac catctgatct ggcttatctt 1080
cttctattgg ttttccact cctgtctcaa tgctgtggca gagcttctgc agtttggaga 1140
ccgcgagttc tacagagatt ggtggaatgc tgagtctgtc acctactttt ggcagaactg 1200
gaatatcccc gtgcacaagt ggtgcatcag acacttctac aagcctatgc tcagacatgg 1260
cagcagcaaa tgggtggcca ggacaggagt atttttgacc tcagccttct tccatgagta 1320
cctagtgagc gttcccctgc ggatgttccg cctctgggca ttcacagcca tgatggctca 1380
ggctcccact gcctggattg tgggcccgatt ctccaaggg aactatggca atgcagctgt 1440
gtgggtgaca ctcatcattg ggcaaccggg ggetgtgtct atgtatgtcc acgactacta 1500
cgtgctcaac tacgatgcc cagtgggggt ctgagctact gccaaaggcc agccctcct 1560
aacctgggoc tggagttctg gaggggttcc tggetgctc cacactctc ctagtctggg 1620
aggcctctct gccctatgg ggctactcct tgctcttggg gatggcattt gaatctcagc 1680
actggtatga gccagtgtct ggagtctgtg ttgtccaggg gctgagggta tcaataaagt 1740
gctgtctaaa accttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa                                     1776
    
```

10 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 10
 tccgtcatcg ctctcaggg 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 11
 gtgcgcgcgga gcccgaaatc 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 15
 <400> 12
 atgcattctg cccccaagga 20
 <210> 13
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Cebador directo
 25
 <400> 13
 tccccgcatc cggaa 15
 <210> 14
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador inverso
 35
 <400> 14
 ctgggtgaag aacagcatct ca 22
 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sonda
 45
 <400> 15
 cgcttctgc tgcgacggat cc 22
 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Cebador directo
 55
 <400> 16
 gaaggtgaag gtcggagtc 19
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso
 5
 <400> 17
 gaagatggtg atgggatttc 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 15
 <400> 18
 gccgcctctc tcgtccattc 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 25
 <400> 19
 gagccgctaa ctaatggacg 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 35
 <400> 20
 acaacggctg cgttgctccg 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 45
 <400> 21
 ccgcccgcgt caggcccgtc 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 55
 <400> 22
 gcctcaccag cgcggtcaac 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 23
 ccctgccggc cgccgtagcc 20
 <210> 24
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 24
 ctccgggccc tagacaacgg 20
 20 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 25
 30 gttcgtagcg cccgaggcgc 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 26
 40 cccggccgca gccaagcgtg 20
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 50 <400> 27
 gcccatggcc tcagcccgca 20
 <210> 28
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 60 <400> 28
 tggctcgagg gccgaccc 20
 <210> 29
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 29
 ccgcaggccc gccgccgccc 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 15
 <400> 30
 ccgcacctct tctccgccc 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 25
 <400> 31
 acgccggcgt ctccgtcctt 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 35
 <400> 32
 gctcccagtg gccgctgccc 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 45
 <400> 33
 ctgcaggcga tggcacctca 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 55
 <400> 34
 aggatgccac ggtagttgct 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 35
 gcatcaccac acaccagttc 20
 <210> 36
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 36
 gccatacttg atgaggttct 20
 20 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 37
 30 gacattggcc gcaataacca 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 38
 40 ctctcaacc tggaatgcag 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 50 <400> 39
 gcagtcccgc ctgctccgtc 20
 <210> 40
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 60 <400> 40
 caggttgct acgtgcagca 20
 <210> 41
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 41
 ccagtaagac cacagccgct 20
 <210> 42
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 42
 ggtgtgcgcc atcagcgcca 20
 20 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 43
 30 cagcactgct ggccttctc 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 44
 40 tgagctcgta gcacaaggctg 20
 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 45
 50 cactgctgga tcagccccac 20
 <210> 46
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 60 <400> 46
 atgcgtgagt agtccatgctc 20
 <210> 47
 <211> 20
 65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 47
 tgagccagat gagtgattg 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 15
 <400> 48
 gagctcagcc acggcattca 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 25
 <400> 49
 tctgccagaa gtaggtgaca 20
 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 35
 <400> 50
 gatgagcgac agccacacag 20
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 45
 <400> 51
 ctcatagttg agcacgtagt 20
 <210> 52
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 55
 <400> 52
 cagtgagaag ccaggccctc 20
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 53
 ccatccccag cactcgaggc 20
 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 15
 <400> 54
 aggatgctgt gcagccaggc 20
 <210> 55
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 25
 <400> 55
 ggtgcaggac agagcccat 20
 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 35
 <400> 56
 gtgtctggcc tgctgcgcc 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 45
 <400> 57
 ctcccagctg gcatcagact 20
 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 55
 <400> 58
 ctacttattt ccattcatcc 20
 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 59
 ttccttaagt atgcctaatt 20
 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 15
 <400> 60
 gcttgagccc ttccttaagt 20
 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 25
 <400> 61
 ctgctgcgg cccaatctc 20
 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 35
 <400> 62
 cccatggctt cggcccgcac 20
 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 45
 <400> 63
 cagccgcgtc tcgcacctc 20
 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 55
 <400> 64
 cggagccggc gcgtcacc 20
 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 65
 ccacgctggt cgcgccgtct 20
 <210> 66
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 15
 <400> 66
 cagatcccag tagccgtcgc 20
 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 25
 <400> 67
 tctgcagac gatggcacct 20
 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 35
 <400> 68
 tcaggatacc acgataattg 20
 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 45
 <400> 69
 cagcatcacc acacaccaat 20
 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 55
 <400> 70
 aacctgcat tactcaggat 20
 <210> 71
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 71
 atccaccagg atgccatact 20
 <210> 72
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 72
 agagacacca cctggatagg 20
 20 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 73
 30 cagcagcccc atctgctctg 20
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 74
 40 gccaggttaa cccatgtag 20
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 50 <400> 75
 aaccagtaag gccacagctg 20
 <210> 76
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 60 <400> 76
 cccactggag tgatagactc 20
 <210> 77
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 77
 atggagtatg atgccagagc 20
 <210> 78
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 78
 acccttcgct ggcggcacca 20
 20 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 79
 30 tggatagctc acagcttgct 20
 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 80
 40 tctcggtagg tcaggtgctc 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 50 <400> 81
 ctcaagaact cgtcgtagca 20
 <210> 82
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 60 <400> 82
 gttggatcag ccccactga 20
 <210> 83
 65 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 83
 gtgaatagtc catatccttg 20
 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 15
 <400> 84
 taagagacgc tcaatgatcc 20
 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 25
 <400> 85
 tctgccacag cattgagaca 20
 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 35
 <400> 86
 ccaatctctg tagaactcgc 20
 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 45
 <400> 87
 gtgacagact cagcattcca 20
 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 55
 <400> 88
 gtctgatgca ccacttgtc 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 89
 tgccatgtct gagcataggc 20
 <210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 15
 <400> 90
 atactcctgt cctggccacc 20
 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 25
 <400> 91
 atgcatag ttccctgga 20
 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 35
 <400> 92
 agtgcaccc acacagctgc 20
 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 45
 <400> 93
 ccaccggtg cccaatgatg 20
 <210> 94
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 55
 <400> 94
 gtggacatac atgagcacag 20
 <210> 95
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 5
 <400> 95
 tagttgagca cgtagtagtc 20
 <210> 96
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 96
 cttggcagt agctcatacc 20
 20 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 <400> 97
 30 tccagaactc caggcccagg 20
 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 98
 40 caagctccc gttctcagcc 20
 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico
 50 <400> 99
 tccattatt agtctaggaa 20
 <210> 100
 <211> 2262
 55 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 100

ggtggccgcg cttcgcctggc tttctgctca tctagggtgg cagcggctac ctacctcagc 60
 tctcgcctcg ctgccgccac ggcctggggc ctgtccctca gctcccggag ctccagcgcg 120
 agccctggcc ccggcggccg gggcatgggt caggggcgcg gcgtgaggcg gctttctgca 180
 cggccgtgac gtgcattggc ttcagcatga agaccctcat cgccgcctac tccgggggtcc 240
 tgcgggggtga gcgtcggggc gaagctgccc gcagcgaaaa caagaataaa ggatctgccc 300
 tgtcacgcga ggggtctggg cgatggggca ctggctccag catcctctca gccctccaag 360
 acatcttctc tgtcacctgg ctcaacagat ctaagggtgga aaaacagctg caggatcatct 420
 cagtactaca atgggtccta tcttctctgg tgctaggagt ggctgcagc gtcacctca 480
 tgtacacctt ctgcacagac tgctggctga tagctgtgct ctacttcacc tggttgcat 540

ttgactggaa cacgcccaag aaagggtggca ggagatcgca gtgggtgcca aactgggccc 600
 tgtggcgcta cttccgagac taacttccca tccagctggt gaagacacac aacctgctga 660
 ccaccaggaa ctatctctt ggataccacc cccatggcat catggcctg ggtgcctct 720
 gtaacttcag cacagaggt actgaagtca gcaagaagtt tctggcata aggcctatt 780
 tggctacggt ggctggtaac ttcggatgc ctgtgcttcg cgagtacctg atgtctggag 840
 gcatctgccc tgtcaaccga gacaccatag actacttget ctccaagaat gggagtggca 900
 atgctatcat catcgtggtg ggaggtgcag ctgagtcct gagctccatg cctggcaaga 960
 acgcagtca cctgaagaac cgcaaaggct ttgtgaaget ggccctgcgc catggagctg 1020
 atctggttcc cacttattcc tttggagaga atgaggtata caagcaggtg atctttgagg 1080
 agggttcctg gggccgatgg gtccagaaga agttccagaa gtatattggt ttcgccccct 1140
 gcatcttcca tggccgaggc ctcttctcct ctgacacctg ggggctggtg cctactcca 1200
 agcccatcac caccgtcgtg ggggagcca tcaactgtcc caagctggag caccgacc 1260
 agaaagacat cgacctgtac catgccatgt acatggaggc cctggtgaag ctctttgaca 1320
 atcacaagac caaatttggc cttccagaga ctgaggtgct ggaggtgaac tgaccagcc 1380
 ctgcgctgcc agctcctggg agggacgact gcagatcctt gcagatcctt tctaccgag 1440
 cattttggtc tgtaaatttg gaagcgtcat ggggtgctgt gggttattta aaagaaatta 1500
 taatgtgtta aaccattgca atgtagatg ttttttaag aagggaaagag tcagtatttt 1560
 aagctcactt ctagtgtgtc ctgctcaagg tggaggtga tatttatggg ccttgggtgg 1620
 ttcttaccce ccccttctag cgttccccag acgacagaca cttggccctg gctagctggg 1680
 caagggcagt ccttagtgac tccagggatt cttgagaggc agaggccatg tcccaccctg 1740
 ggctgcaggt cgggttcctc gtaccaaggg gaggctgagg gcacagctgg cccacttgg 1800
 ggagggtaga taacatctgg actgcccggc ttgggtctct gctcctcacc ctagecctct 1860
 tctccaatct gagcctacc tggcctcctg tctcctggct agggacacgg ctgtcccaca 1920
 ggtgccgtct tgggttatct cgctgctggt ggctggtttc actctggagg ttggcaccat 1980
 ggacacagct cagcgttget ctggcgcata tctcctgag ccacaccca agtctggtgt 2040
 gaggaagggc ttctcttctc ttcacagagg tgctggctt cctgtgcagc acactgggtc 2100
 caggacagga ggccccccc ccaaaccaag cctcagctgt gtgcctttat gaggcgttgg 2160
 gagaaagcta cctcctgtg tattctgttt tctccatgag attgttgtgc catgtcacac 2220
 ttttgtatat tctagacta ataatggaa acaagaacag cc 2262

- <210> 101
- <211> 1751
- <212> ADN
- <213> Rattus norvegicus
- <400> 101

```

gaagattggg cgcgcacgag gtgcgggccc aagccatggg cgaccgcgga ggcgcgggaa 60
gctctcggcg tcgcaggacc ggctcgcggg tttccgtcca gggaggtagt gggcccaagg 120
tagaagagga cgaggtgcga gaagcggctg tgagccccga cttgggcgcc gggggtgacg 180
cgccggctcc ggctccggct ccagcccata cccgggacaa agaccggcag accagcgtgg 240
gcgacggcca ctgggagctg aggtgccatc gtctgcaaga ctctttgttc agctcagaca 300
gcggtttcag caattaccgt ggtatcctg attggtgcgt ggtgatgctg atcctgagta 360
atgcaaggtt atctttagag aatcttatca agtatggcat cctggtggat cccatccagg 420
tggtgtctct gtttctgaag gacccctaca gctggcctgc cccatgcttg atcattgcat 480
ccaatatctt tattgtggct acatttcaga ttgagaagcg cctgtcagtg ggtgccctga 540
cagagcagat ggggctgctg ctacatgtgg ttaacctggc cacaattatc tgcttccag 600
cagctgtggc cttactgggt gagtctatca ctccagtggg ttccctgttt gctctggcat 660
catactccat catcttccctc aagctttctt cctaccggga tgtcaatctg tggtgccgcc 720
agcgaagggt caaggccaaa gctgtgtctg cagggaagaa ggtcagtggt gctgctgcc 780
agaacactgt aagctatccg gacaacctga cctaccgaga tctctattac ttcattcttg 840
ctcctacttt gtgttatgaa ctcaactttc ctcgatcccc ccgaatacga aagcgtttc 900
tgctacggcg ggttcttgag atgctctttt tcaccagct tcaagtggg ctgatccagc 960
agtggatggt ccctactatc cagaactcca tgaagcctt caaggacatg gactattcac 1020
gaatcattga gcgtctotta aagctggcgg tccccacca tctgatatgg ctcatcttct 1080
tctattggct tttccactca tgtctcaatg ctgtggcaga gctcctgcag tttggagacc 1140
gcgagttcta cagggactgg tggaatgctg agtctgtcac ctacttttgg cagaactgga 1200
atatccccgt gcacaagtgg tgcacagac acttttacia gcctatgctc agactgggca 1260
gcaacaaatg gatggccagg actggggtct tttgggcgtc agctttcttt catgagtacc 1320
tagtgagcat tcccctgagg atgttccgcc tttgggcatt cacagcaatg atggctcagg 1380
tcccactggc ctggattgtg aaccgcttct tccaagggaa ctatggcaat gcagctgtgt 1440
gggtgacact catcattggg caaccgggtg ctgtgctcat gtatgtccac gactactacg 1500
tgctcaacta tgatgoccca gtgggggcat gagctactgc caaaggccag cctccctaac 1560
ctgggcctgg agttctggag ggcttctctg tgctgcacac tcccctagtt tggaggcctt 1620
tctgccccta tggggcctac tctgctctt ggggatggcc ctgagccagc tggttgagcc 1680
agtgctggga gtttgtgctg accaggggct taggatatca ataaagagct atctaaaaaa 1740

```

aaaaaaaaa a 1751

5 <210> 102
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo

<400> 102
 cagaccagcg tgggcg 16

15 <210> 103
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda inversa

<400> 103
 gaacaaagag tcttcagac gatg 24

25 <210> 104
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

<400> 104
 cggccactgg gagctgaggt g 21

5 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 105
 tcgccatgg ctcggcccg 20

15 <210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 106
 agctcccg gcctccgcg 20

25 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 107
 ggtctgcca gccgagagc 20

35 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 108
 ctggacggaa acccgagc 20

<210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 109
 tacctgggc ccactacctc 20

55 <210> 110
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

65 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 110
 tcgcacctcg tcctttcta 20

5
 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

15
 <400> 111
 gagccggcgc gtcacccccg 20

20
 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <400> 112
 tatgggctgg agccggagcc 20

30
 <210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

40
 <400> 113
 ccgggtatgg gctggagccg 20

45
 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

55
 <400> 114
 tcgccacgc tggctgccg 20

60
 <210> 115
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 116
 ctgtctgagc tgaacaaaga 20

5 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 117
 aggataccac ggtaattgct 20

15 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 118
 caccaattca ggataccacg 20

25 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 119
 gcattactca ggatcagcat 20

35 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 120
 ctaaagataa ccttgatta 20

<210> 121
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 121
 actgataag attctctaaa 20

55 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

65 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 122
 ccaccaggat gccatacttg 20

5 <210> 123
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

15 <400> 123
 ggatccacca ggatgccata 20

20 <210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

30 <400> 124
 aaacagagac accacctgga 20

35 <210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 125
 ggatgcaatg atcaagcatg 20

50 <210> 126
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

60 <400> 126
 acaataaaga tattggatgc 20

65 <210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

75 <400> 127
 cttctcaatc tgaatgtag 20

80 <210> 128
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

85 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 128
 aggcgcttct caatctgaaa 20

5 <210> 129
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

15 <400> 129
 gctctgtcag ggcaccct 20

20 <210> 130
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

30 <400> 130
 agccccatct gctctgtcag 20

35 <210> 131
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 131
 accacatgta gcagcagccc 20

50 <210> 132
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

60 <400> 132
 gggaagcaga taattgtggc 20

65 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

75 <400> 133
 aagccacag ctgctgggaa 20

80 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

85 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 134
 agactcaacc agtaaggcca 20

5 <210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 135
 tggagtgata gactcaacca 20

15 <210> 136
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 136
 ggagtatgat gccagagcaa 20

25 <210> 137
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 137
 gaggaagatg atggagtatg 20

35 <210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 138
 ccggtaggaa gaaagcttga 20

<210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 139
 ccttcgctgg cggcaccaca 20

55 <210> 140
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

65 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 140
 acagcttgg ccttgaccct 20

5 <210> 141
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

15 <400> 141
 accttctcc ctgcagacac 20

<210> 142
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

25 <400> 142
 cagcagcccc actgacctc 20

<210> 143
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

35 <400> 143
 gatagcttac agtgttctgg 20

<210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 144
 ggtaggtcag gttgtccgga 20

<210> 145
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

55 <400> 145
 agagatctcg gtaggtcagg 20

<210> 146
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

65 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 146
 aagatgaagt aatagagatc 20

5
 <210> 147
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

15
 <400> 147
 acaaagtagg agcaaagatg 20

20
 <210> 148
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

30
 <400> 148
 aagttgagtt cataacacaa 20

35
 <210> 149
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45
 <400> 149
 aaaaagagca tctcaagaac 20

50
 <210> 150
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

60
 <400> 150
 cagccccact tgaagctggg 20

65
 <210> 151
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

75
 <400> 151
 catccactgc tggatcagcc 20

80
 <210> 152
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

85
 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 152
 ggagtctcgg atagtaggga 20

5 <210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 153
 aagggtctca tggagtctg 20

15 <210> 154
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 154
 catgtccttg aagggtctca 20

25 <210> 155
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 155
 cgccagcttt aagagacgct 20

35 <210> 156
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 156
 gctctgccac agcattgaga 20

<210> 157
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 157
 tagaactcgc ggtctccaaa 20

55 <210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

65 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 158
 ggtgacagac tcagcattcc 20

5 <210> 159
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

15 <400> 159
 gatattccag ttctgcaaaa 20

20 <210> 160
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

30 <400> 160
 tgtctgatgc accactgtg 20

35 <210> 161
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 161
 agaccccagt cctggccatc 20

50 <210> 162
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

60 <400> 162
 tactcatgaa agaaagctga 20

65 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

75 <400> 163
 cattgctgtg aatgcccaaa 20

80 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

85 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 164
 acaatccagg ccagtgggac 20

5 <210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 165
 tgcattgcca tagtccctt 20

15 <210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 166
 gcccaatgat gagtgcacc 20

25 <210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 167
 gtagtcgtgg acatacatga 20

35 <210> 168
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 168
 ttggcagtag ctcatgcccc 20

<210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 169
 ctggcctttg gcagtagctc 20

55 <210> 170
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

65 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 170
 cctccagaac tccaggccca 20

5 <210> 171
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 171
 atccccaaga gcaggagtag 20

15 <210> 172
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 172
 cccagcactg gctcaaccag 20

25 <210> 173
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

<400> 173
 ttgatatcct aagcccctgg 20

35 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Compuesto oligomérico

45 <400> 174
 tttttttt ttagatagct 20

50

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido dirigido a un ácido nucleico que codifica un polipéptido DGAT-1 para su uso en la mejora, tratamiento o prevención de la fibrosis hepática
- 5 2. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1 dirigido a un ácido nucleico que tiene al menos una identidad del 80% con la SEC ID N° 4 y que expresa la DGAT-1.
3. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que es un compuesto antisentido quimérico que comprende un intervalo de longitud de nucleósidos consecutivos en el que el extremo superior del intervalo es de 50 nucleósidos y en el que el extremo inferior del intervalo es de 12 nucleósidos, que comprende adicionalmente uno o más de
 - 10 una modificación de nucleobase,
 - una modificación de enlace internucleosídico,
 - una modificación glucídica de alta afinidad seleccionada del grupo constituido por n 2'-O-(2-metoxietilo), un 2'-O-metilo, un ácido nucleico bloqueado o un ácido nucleico con puentes de etileno
 - 15 o una combinación de las mismas, y que comprende adicionalmente no más de tres emparejamientos erróneos con la secuencia de ácido nucleico diana (SEC ID N° 4) que codifica la DGAT-1.
4. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3 en el que:
 - 20 a. el extremo superior del intervalo es de 35 nucleósidos y el extremo inferior del intervalo es de 14 nucleósidos;
 - b. el extremo superior del intervalo es de 24 nucleósidos y el extremo inferior del intervalo es de 17 nucleósidos; o
 - c. el compuesto antisentido quimérico tiene una longitud de 20 nucleósidos consecutivos.
5. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3 ó 4, en el que al menos un enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato, o cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato.
- 25 6. El oligonucleótido antisentido de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en el que la modificación de nucleobase es una 5-metil citosina.
7. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 3, en el que el compuesto antisentido tiene una longitud de 20 nucleósidos consecutivos, que comprende cinco modificaciones 2'-O-(2-metoxietilo) glucídicas consecutivas en el extremo 5' del compuesto, seguidas por diez 2'desoxi glúcidos consecutivos que están seguidos por cinco modificaciones 2'-O-(2-metoxietilo) glucídicas consecutivas en el extremo 3' del compuesto, que también comprende
 - 30 una modificación de enlace fosforotioato en cada enlace internucleosídico y una modificación 5-metil citosina en cada resto de citosina en el compuesto y que comprende no más de 3 emparejamientos erróneos con la secuencia de ácido nucleico que codifica la DGAT-1 diana.
8. El oligonucleótido antisentido de una cualquiera de las reivindicaciones 3-7, en el que el compuesto antisentido no comprende ningún emparejamiento erróneo con la secuencia de ácido nucleico que codifica la DGAT-1 diana.
- 35 9. El oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación anterior, en el que la administración del oligonucleótido antisentido:
 - a. reduce la expresión de ARNm de colágeno;
 - b. reduce uno o más de un ARNm de α -SMA o un ARNm de TGF. β .;
 - 40 c. reduce los niveles de hidroxiprolina;
 - d. aumenta la esterificación de retinol; o
 - e. reduce la activación de las células estrelladas hepáticas.
10. El oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación anterior para su uso en la mejora, tratamiento o prevención de la fibrosis hepática, siendo dicho uso para prevenir, mejorar o tratar la deposición de colágeno en exceso en el hígado de un animal que necesita dicho tratamiento, poner en contacto al animal con el oligonucleótido antisentido.
- 45 11. El oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación anterior en un animal que necesita dicho tratamiento, teniendo el animal una afección que produce fibrosis hepática, seleccionándose la afección del grupo constituido por esteatosis hepática, EHNA, EHGNA, obesidad, diabetes mellitus, dislipidemia, resistencia a insulina, síndrome metabólico, colesterolemia o combinaciones de los mismos.

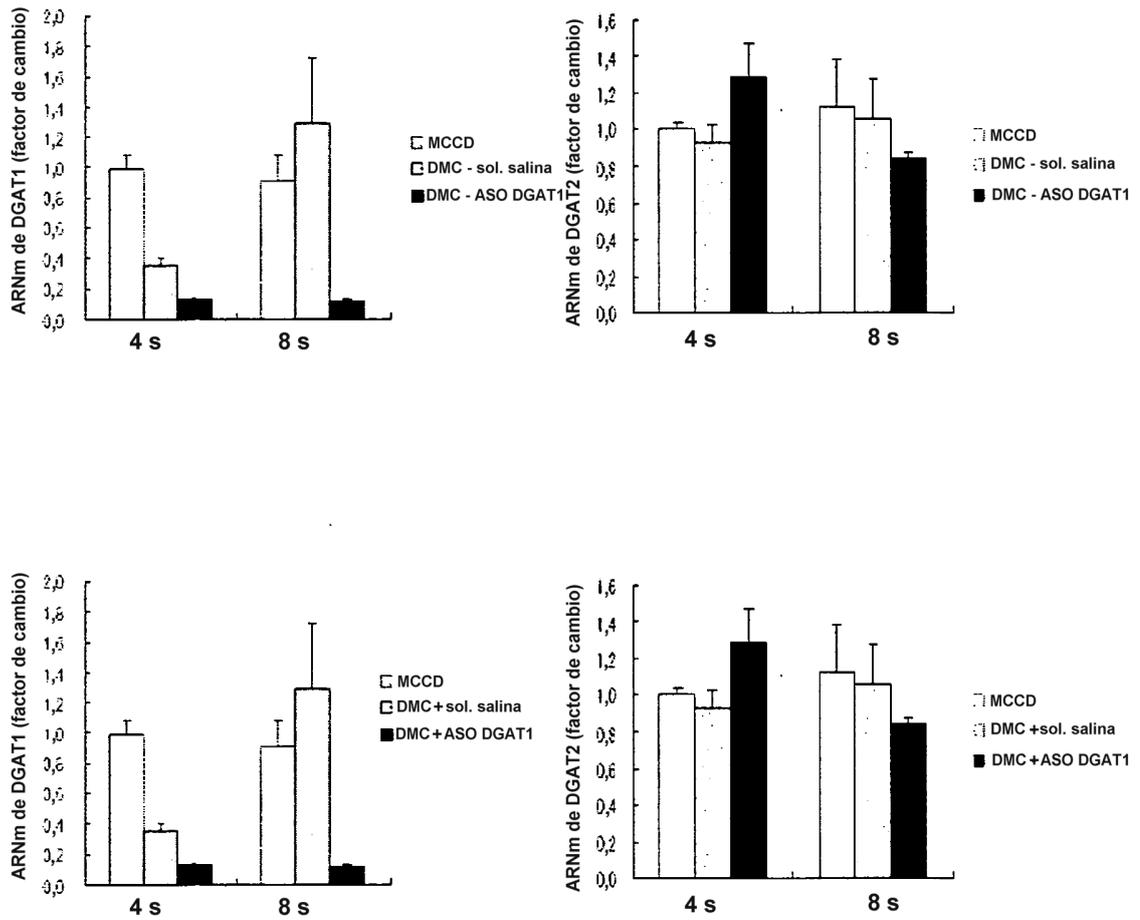


Figura 1

Datos bioquímicos

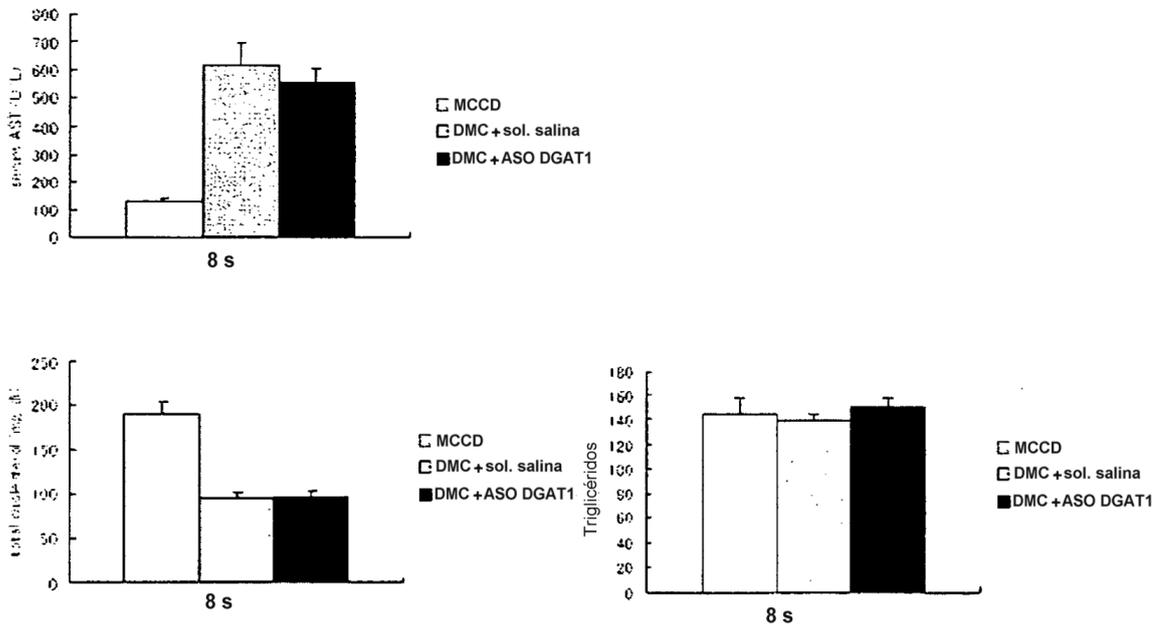


Figura 2

Tinción de aceite rojo O (x100), 4 semanas

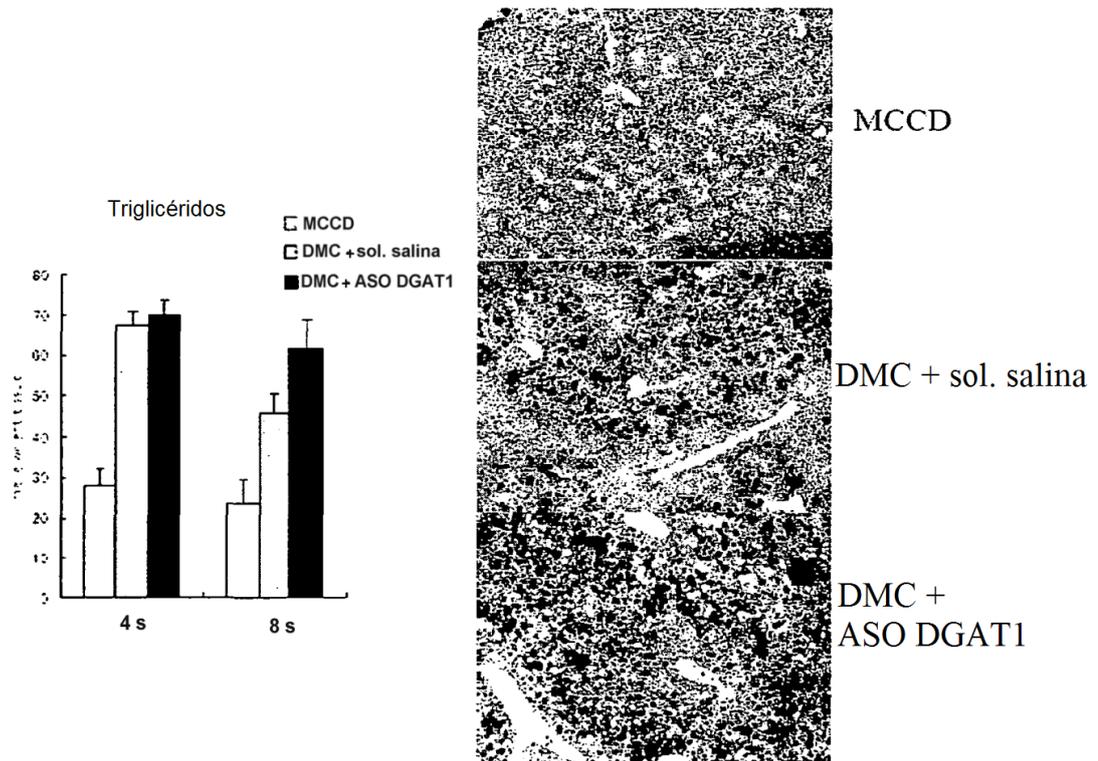


Figura 3

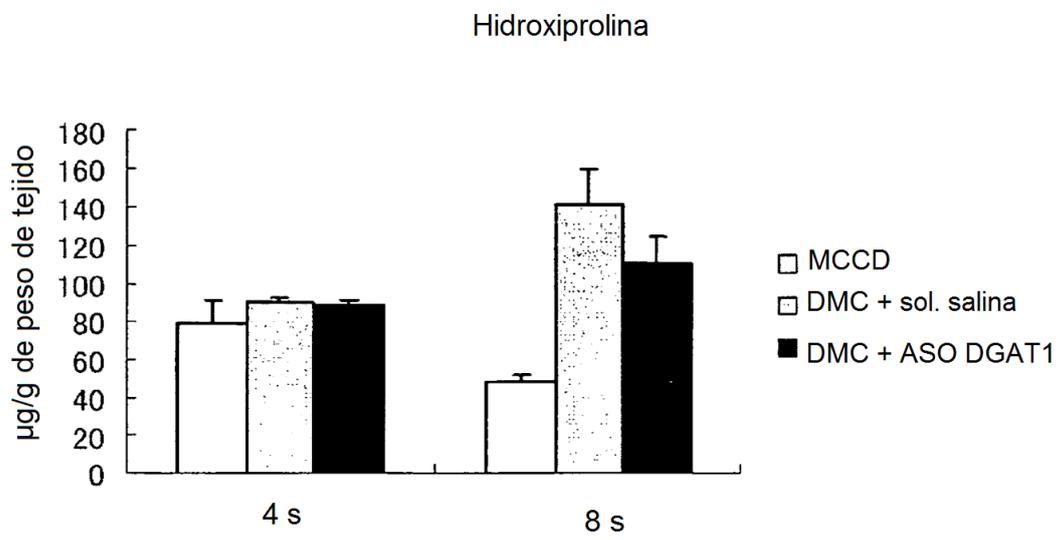


Figura 4

Expresión de ARNm de colágeno-1, aSMA y TGFb-1 en hígado de ratones db/db

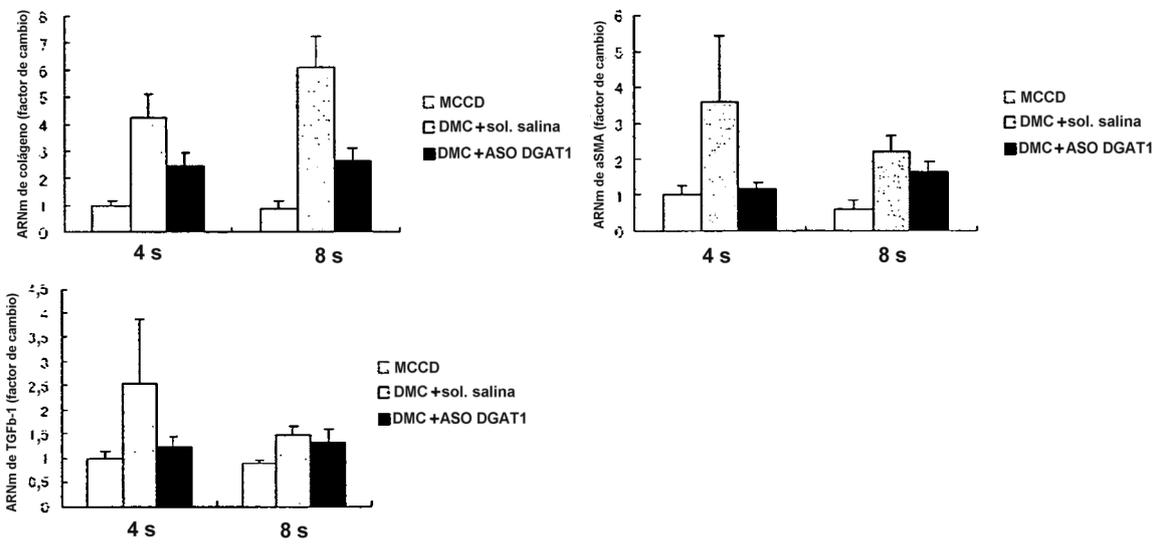


Figura 5

Expresión de ARNm de DGAT1, 2 y TNFa en ratones db/db

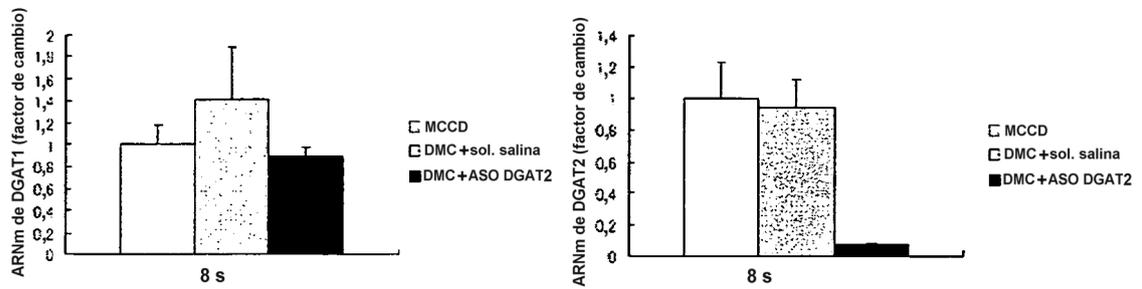


Figura 6

Tinción de aceite rojo O (x100), 4 semanas

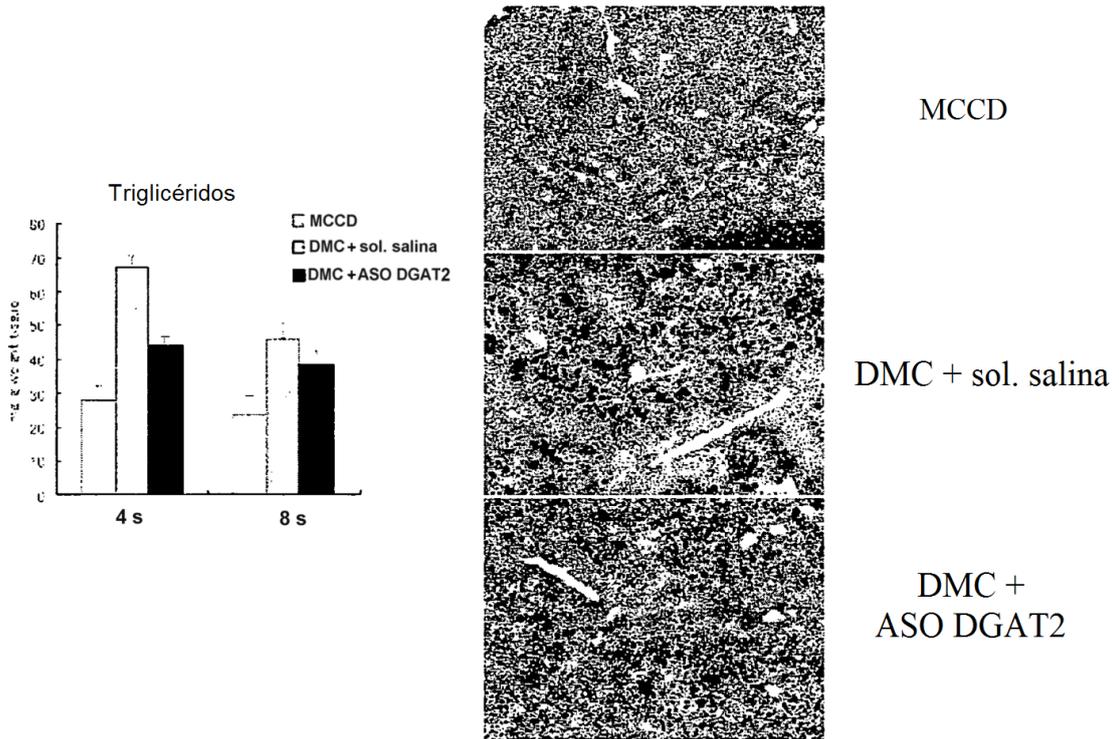


Figura 7

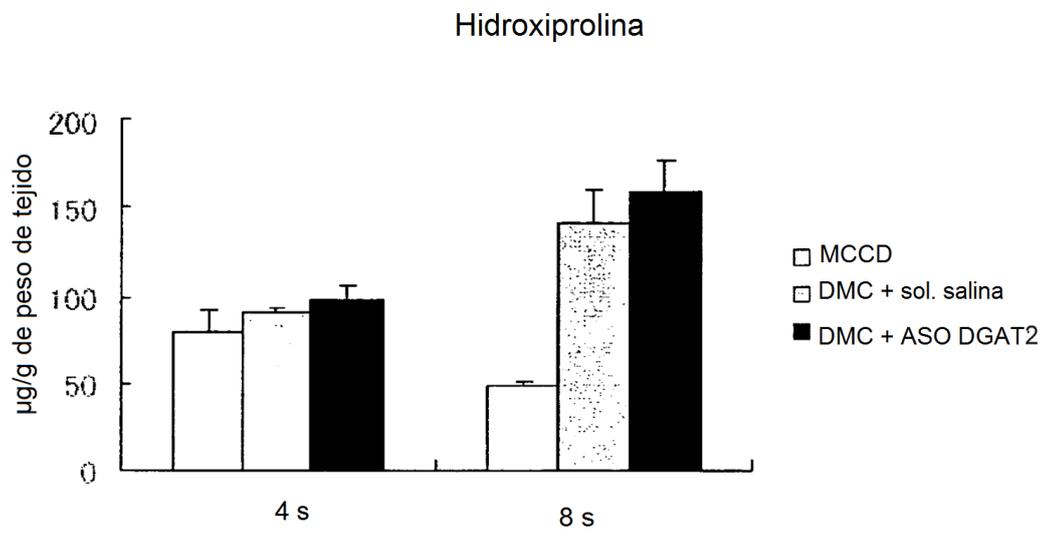


Figura 8

Expresión de ARNm de colágeno, α SMA, TGF β -1 y TIMP-1
en hígado de ratones db/db

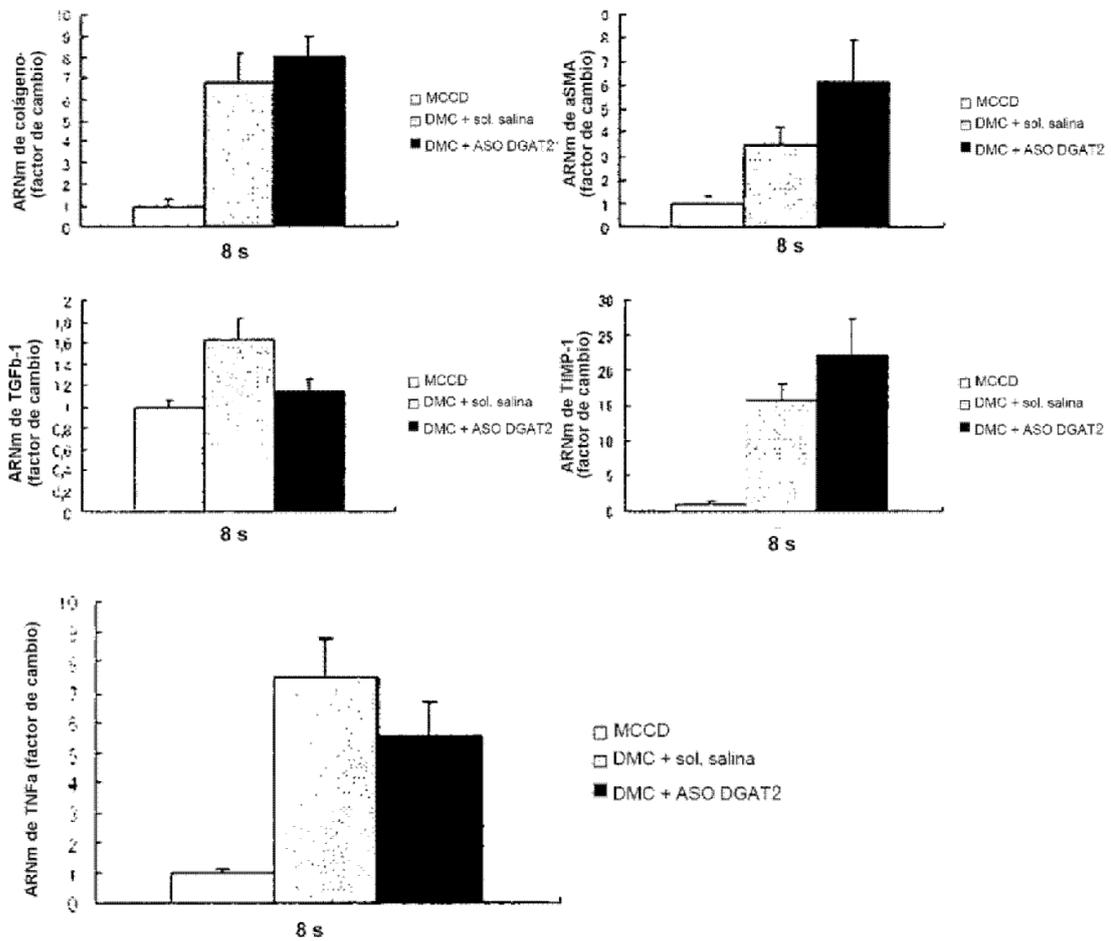


Figura 9