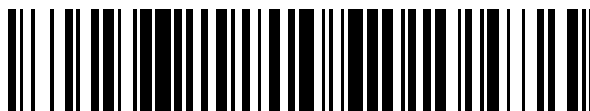


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 879**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2003 E 10180483 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2336318**

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

30 Prioridad:

**13.11.2002 US 426234 P**  
**15.05.2003 WO PCT/US03/15493**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.08.2013**

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)**  
**500 Kendall Street**  
**Cambridge, MA 02142 , US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 417 879 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Modulación antisentido de la expresión de la apolipoproteína B

**Campo de la invención**

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

**Antecedentes de la invención**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Se encontró que ratones transgénicos que expresan la apolipoproteína B humana y alimentados con una dieta alta en grasa, desarrollaban niveles altos de colesterol en el plasma y presentaban un aumento de 11 veces de las lesiones ateroscleróticas frente a las crías de la misma camada no transgénicas (Kim and Young, *J. Lipid Res.*,

1998, 39, 703-723; Nishina et al., *J. Lipid Res.*, 1990, 31, 859-869).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Está surgiendo la tecnología antisentido como un medio eficaz de reducir la expresión de productos génicos

específicos y por lo tanto puede llegar a ser singularmente útil en una serie de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación que implican la modulación de la expresión de la apolipoproteína B.

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

**5 Compendio de la invención**

10 La invención proporciona un compuesto oligonucleótido antisentido de 20 bases nucleicas de longitud que tiene una secuencia de bases nucleicas como se expone en la SEQ ID NO: 247 y que comprende 5-metilcitosina en las bases nucleicas 2, 3, 5, 9, 12, 15, 17, 19 y 20, en donde cada enlace internucleósido es un enlace fosforotioato, las bases nucleicas 1-5 y 16-20 comprenden una modificación 2'-metoxietoxi, y las bases nucleicas 6-15 son desoxinucleótidos.

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

La invención también proporciona el compuesto oligonucleótido antisentido de la invención o la composición de la invención, para usar en la terapia o profilaxis de una enfermedad.

15 La invención también proporciona el compuesto oligonucleótido antisentido de la invención o la composición de la invención, para usar en el tratamiento de la hipercolesterolemia en un ser humano.

La invención también proporciona el compuesto oligonucleótido antisentido de la invención o la composición de la invención, para usar en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, tal como la aterosclerosis, en un ser humano.

20 La invención también proporciona el compuesto oligonucleótido antisentido de la invención o la composición de la invención, para usar en el tratamiento de la hiperlipidemia en un ser humano.

La invención también proporciona el compuesto oligonucleótido antisentido de la invención o la composición de la invención, para usar en el tratamiento de la diabetes en un ser humano.

25 La invención también proporciona el compuesto oligonucleótido antisentido de la invención o la composición de la invención, para usar en el tratamiento de la obesidad en un ser humano.

La invención también proporciona el uso del compuesto oligonucleótido antisentido de la invención en la preparación de un medicamento para tratar la hipercolesterolemia en un ser humano.

La invención también proporciona el uso del compuesto oligonucleótido antisentido de la invención en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad cardiovascular, tal como la aterosclerosis, en un ser humano.

30 La invención también proporciona el uso del compuesto oligonucleótido antisentido de la invención en la preparación de un medicamento para tratar la hiperlipidemia en un ser humano.

La invención también proporciona el uso del compuesto oligonucleótido antisentido de la invención en la preparación de un medicamento para tratar la diabetes en un ser humano.

35 La invención también proporciona el uso del compuesto oligonucleótido antisentido de la invención en la preparación de un medicamento para tratar la obesidad en un ser humano.

**Compendio de la descripción**

La presente descripción se refiere a compuestos, en particular oligonucleótidos antisentido, que están dirigidos a un ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B, y que modulan la expresión de la apolipoproteína B. También se describen composiciones farmacéuticas y otras composiciones que comprenden los compuestos de la descripción.

40 Además, se describen métodos para modular la expresión de la apolipoproteína B en células o tejidos, que comprenden poner en contacto dichas células o tejidos con uno o más compuestos antisentido o composiciones de la descripción. Además se describen métodos de tratamiento de un animal, en particular un ser humano, que se sospecha que tiene o es propenso a tener una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B, por administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más compuestos antisentido o composiciones de la descripción.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 También se describen en la presente memoria métodos para modular los niveles de triglicéridos en el suero en un animal, que comprenden administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un

compuesto de la descripción. En un aspecto, el animal es un ser humano.

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

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

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

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

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

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

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

compuesto de la descripción suficiente para reducir la expresión de la apolipoproteína B.

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

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

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

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

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

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

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



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

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

10 La invención proporciona un compuesto oligonucleótido antisentido de 20 bases nucleicas de longitud que tiene una secuencia de bases nucleicas como se expone en la SEQ ID NO: 247 y que comprende 5-metilcitosina en las bases nucleicas 2, 3, 5, 9, 12, 15, 17, 19 y 20, en el que cada enlace internucleósido es un enlace fosforotioato, las bases nucleicas 1-5 y 16-20 comprenden una modificación 2'-metoxietoxilo, y las bases nucleicas 6-15 son desoxinucleótidos.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Descripción detallada de la invención

50 La presente invención usa compuestos oligómeros, específicamente oligonucleótidos antisentido, para usar en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican la apolipoproteína B, modulando finalmente la cantidad de apolipoproteína B producida. Esto se logra proporcionando compuestos antisentido que hibridan específicamente con uno o más ácidos nucleicos que codifican la apolipoproteína B. Como se usa en la presente memoria, las expresiones "ácido nucleico diana" y "ácido nucleico que codifica la apolipoproteína B" abarcan ADN que codifica la apolipoproteína B, ARN (incluyendo pre-ARNm y ARNm) transcritos a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN. La hibridación específica de un compuesto oligomérico con un ácido nucleico diana

interfiere con la función normal del ácido nucleico. Esta modulación de la función de un ácido nucleico diana por compuestos con los que hibrida específicamente se denomina "antisentido". Las funciones del ADN con las que se va a interferir incluyen la replicación y transcripción. Las funciones del ARN con las que se va a interferir incluyen todas las funciones vitales tales como, por ejemplo, translocación del ARN al sitio de traducción de proteínas, traducción de proteínas a partir de ARN, empalme del ARN para dar una o más especies de ARNm y actividad catalítica en la que puede estar implicado o ser facilitada por el ARN. El efecto global de dicha interferencia con la función del ácido nucleico diana es la modulación de la expresión de la apolipoproteína B. En el contexto de la presente invención, "modulación" significa un aumento (estimulación) o una disminución (inhibición) de la expresión de un gen. En el contexto de la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación de la expresión génica y el ARNm es una diana preferida.

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

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

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

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

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

En el contexto de esta invención, "hibridación" significa enlace de hidrógeno, que puede ser enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inversos. Por ejemplo, la adenina y la timina son bases nucleicas complementarias que se aparean mediante la formación de enlaces hidrógeno. "Complementario," como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad para el apareamiento preciso entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una determinada posición de un oligonucleótido es capaz de formar enlace de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de ADN o ARN, entonces se considera que el nucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno unos con otros. Por lo tanto, "que puede hibridar específicamente" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento preciso de modo que se produce una unión específica y estable entre los oligonucleótidos y al ADN o ARN diana. Se entiende en la técnica que la secuencia de un compuesto antisentido no es necesario que sea 100% complementaria de la de su ácido nucleico diana para que puede hibridar específicamente. Un compuesto antisentido puede hibridar específicamente cuando la unión del compuesto a la molécula de ADN o ARN diana interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para producir una pérdida de utilidad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a las secuencias que no son diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos in vitro, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

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

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

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

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

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

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

especial seres humanos.

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

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

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

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

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

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

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

principales de amida; y otras que tienen partes con componentes N, O, S y CH<sub>2</sub> mezclados.

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

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

Las realizaciones más preferidas de la invención son oligonucleótidos con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales con heteroátomos, y en particular -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- [conocido como cadena principal de metil(metilimino) o MMI], -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- y -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- [en los que la cadena principal de fosfodiéster natural está representada como -O-P-O-CH<sub>2</sub>-] en la patente de EE.UU. citadas antes 5.489.677, y las cadenas principales de amida de la patente de EE.UU. citada antes 5.602.240. También se prefieren los oligonucleótidos que tienen estructuras de cadena principal de morfolino de la patente de EE.UU. citadas antes 5.034.506.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo de C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> o alqueno y alquino de C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> sustituidos o no sustituidos. Se prefieren en particular O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, en los que n y m son de aproximadamente 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocida como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoxietoxi, es decir un grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos a continuación, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, también descrito en los ejemplos a continuación.

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

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

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases nucleicas (denominadas frecuentemente en la técnica simplemente como "bases"). Tal y como se emplea en la presente memoria, las bases nucleicas "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases púricas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases nucleicas modificadas incluyen otras bases nucleicas

naturales o sintéticas tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados 6-metilo y otros alquilo de adenina y guanina, derivados 2-propilo y otros alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halogenouracilo y citosina, derivados 5-propinilo (-C≡C-CH<sub>3</sub>) de uracilo y citosina y otros derivados de alquilo de bases pirimidínicas, 6-azo-uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras 8-sustituidas adeninas y guaninas, 5-halógeno en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros 5-sustituido uracilos y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-deazaguanina y 3-desazaadenina. Las bases nucleicas modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina-citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina-citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), pinzas G tales como una fenoxazina-citidina sustituida (p. ej. 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol-citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol-citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las bases nucleicas modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base púrica o pirimidínica es sustituida por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desazaadenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Ácidos nucleicos adicionales incluyen los descritos en la patente de EE.UU. nº 3.687.808, los descritos en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos descritos por Englisch et al., *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613, y aquellos descritos por Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunos de estas bases nucleicas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligómeros de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del ácido nucleico dúplex en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y actualmente son las sustituciones de bases preferidas, incluso más en particular cuando se combinan con modificaciones 2'-O-metoxietilo en el azúcar.

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

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica la unión química al oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercalantes, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación de oligómeros, potencian la resistencia de los oligómeros a la degradación, y/o refuerzan la hibridación específica de secuencia con el ARN. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la captación del oligómero, distribución, metabolismo o excreción. Los grupos conjugados representativos se describen en la solicitud de patente internacional PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre, 1992. Los restos conjugados incluyen, pero sin limitar, restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, p. ej., hexil-S-tritilol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, p. ej., restos dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano-acético (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilaminocarbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277, 923-937). Los oligonucleótidos de la invención también se pueden conjugar con sustancias que son fármacos activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos 09/334,130 (presentada el 15 de junio, 1999).

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero sin limitar, las patentes de EE.UU.: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465;

5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717. 5.580.731. 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241. 5.391.723. 5.416.203. 5.451.463. 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado sean modificadas de forma uniforme, y se puede incorporar más de una de las modificaciones mencionadas antes en un solo compuesto o incluso en un solo nucleósido en un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos antisentido, en particular oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica de modo que confiere al oligonucleótido una resistencia incrementada frente a la degradación con nucleasas, una mayor captación celular y/o un aumento de la afinidad de la unión con el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir ARN:ADN o híbridos de ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de la RNasa H, produce la escisión del ARN diana, potenciando así mucho la eficacia de la inhibición de la expresión génica por el oligonucleótido. Por consiguiente, a menudo se pueden obtener resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se usan oligonucleótidos quiméricos, comparado con fosforotioatos de desoxioligonucleótidos que hibridan con la misma región diana. La escisión del ARN diana se puede detectar rutinariamente mediante electroforesis en gel y, si es necesario, técnicas asociadas de hibridación de ácidos nucleicos, conocidas en la técnica.

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

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

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

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

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

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

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

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se forman con metales o aminas, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Los ejemplos de metales usados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Los ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletildiamina, clorprocaína, colina, dietanolamina, dicitclohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina, y procaína (véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts," *J. of Pharma Sci.*, 1977, 66, 1-19). Las sales de adición de base de dichos compuestos ácidos se preparan poniendo en contacto la forma de ácido libre con una cantidad suficiente de la base deseada para producir la sal en la forma convencional. La forma de ácido libre se puede regenerar poniendo en contacto la forma de sal con un ácido y aislando el ácido libre de la forma convencional. Las formas de ácido libre difieren algo de sus respectivas formas de sal en algunas propiedades físicas tales como la solubilidad en disolventes polares, pero por lo demás las sales son equivalentes a sus respectivos ácidos libres para los propósitos de la presente invención. Como se usa en la presente memoria, una "sal de adición farmacéuticamente" incluye una sal farmacéuticamente aceptable de una forma ácida de uno de los componentes de las composiciones de la invención. Estas incluyen sales de ácidos orgánicos e inorgánicos de las aminas. Las sales de ácido preferidas son hidrocloruros, acetatos, salicilatos, nitratos y fosfatos. Otras sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas para los expertos en la técnica, e incluyen sales básicas de una variedad de ácidos inorgánicos y orgánicos, tales como, por ejemplo, con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; con ácidos orgánicos carboxílicos, sulfónicos, sulfo o fosfo, o ácidos sulfámicos N-sustituídos, por ejemplo, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido enbónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico; con aminoácidos, tales como los 20 alfa-aminoácidos implicados en la síntesis de proteínas en la naturaleza, por ejemplo ácido glutámico o ácido aspártico, y también ácido fenilacético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 4-metilbencenosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, 2- o 3-fosforoglicerato, glucosa-6-fosfato, ácido N-ciclohexilsulfámico (con la formación de ciclamatos), o con otros compuestos orgánicos ácidos, tales como ácido ascórbico. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos también se pueden preparar con un catión farmacéuticamente aceptable. Los cationes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos para los expertos en la técnica, e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio y amonio cuaternario. También son posibles los carbonatos e hidrogenocarbonatos.

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

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

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

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



Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para la administración tópica pueden incluir parches intradérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o convenientes. También pueden ser útiles los preservativos recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones típicas preferidas incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención están mezclados con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes de quelación y tensioactivos. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen los neutros (p. ej. dioleoilfosfatidil-etanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidil-colina DMPC, diestearoilfosfatidil-colina), negativos (p. ej. dimiristoilfosfatidil-glicerol DMPG) y catiónicos (p. ej. dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidil-etanolamina DOTMA). Los oligonucleótidos de la invención se pueden encapsular en liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres preferidos incluyen, pero sin limitar, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, gliceril-1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster de alquilo C<sub>1-10</sub> (p. ej. miristato de isopropilo IPM), monoglicérido, diglicérido o sus sales farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos 09/315.298 presentada el 20 de mayo, 1999.

Las composiciones y formulaciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o disoluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser convenientes los espesantes, agentes de sabor, diluyentes, emulsionantes, ayudantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los oligonucleótidos de la invención se administran junto con uno o más tensioactivos potenciadores de la penetración o quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sus sales, ácidos biliares y/o sus sales. Los ácidos/sales biliares preferidos incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio, glicodihidrofusidato de sodio. Los ácidos grasos preferidos incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una de sus sales farmacéuticamente aceptable (p. ej., de sodio). También se prefieren combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Una combinación particularmente preferida es la sal de sodio del ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Otros potenciadores de la penetración incluyen el éter polioxietilén-9-laurilo, éter de polioxietilén-20-cetilo. Los oligonucleótidos de la invención se pueden suministrar por vía oral en forma granular incluyendo partículas secadas por atomización, o complejadas para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejación de oligonucleótidos incluyen:

poliaminoácidos; poliiiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiiminas derivatizadas con DEAE, pululanos, celulosas y almidones. Los agentes de complejación particularmente preferidos incluyen quitosán, N-trimetilquitosán, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, poltiodietilaminometilileno P (TDAE), poliaminoestireno (e.g. p-amino), poli(cianoacrilato de metilo), poli(cianoacrilato de etilo), poli(cianoacrilato de butilo), poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(cianoacrilato de isohexilo), metacrilato de DEAE, hexilacrilato de DEAE, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(D,L-ácido láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato, y polietilenglicol (PEG). Se describen otras formulaciones orales para oligonucleótidos y su preparación en detalle en las solicitudes de Estados Unidos 08/886.829 (presentada el 1 de julio, 1997), 09/108.673 (presentada el 1 de julio, 1998), 09/256.515 (presentada el 23 de febrero, 1999), 09/082.624 (presentada el 21 de mayo, 1998) y 09/315.298 (presentada el 20 de mayo, 1999).

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

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

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

necesario, moldeando el producto.

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

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

#### Emulsiones

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

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

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

Los emulsionantes naturales usados en formulaciones de emulsiones incluyen lanolina, cera de abeja, fosfátidos, lecitina y goma arábiga. Las bases de absorción tienen propiedades hidrófilas de modo que se pueden empapar en agua para formar emulsiones de ag/ac que todavía retienen la consistencia semisólida, tal como lanolina anhidra y vaselina hidrófila. También se han usado los sólidos finamente divididos como buenos emulsionantes, en especial en combinación con tensioactivos en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como

hidróxidos de metales pesados, arcillas que no se hinchan tales como bentonita, atapulguita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio y magnesio coloidal, pigmentos, y sólidos no polares tales como carbón o triestearato de glicerilo.

5 También están incluidos una gran variedad de materiales no emulsionantes en formulaciones en emulsión y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

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

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

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

35 En una realización de la presente invención, las composiciones de oligonucleótidos y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y compuesto anfífilo, que es una sola disolución líquida termodinámicamente estable y ópticamente isotrópica (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Típicamente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una disolución acuosa de tensioactivo y después añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, en general un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles que están estabilizados mediante películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung and Shah, en: *Controlled Release of Drugs: polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Las microemulsiones normalmente se preparan por una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, cotensioactivo y electrolito. El que la microemulsión sea del tipo de agua en aceite (ag/ac) o de aceite en agua (ac/ag) depende de las propiedades del aceite y el tensioactivo usados y de la estructura y el empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y colas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985, p. 271).  
40  
45  
50

Se ha estudiado ampliamente el procedimiento fenomenológico que usa diagramas de fases y ha dado un conocimiento exhaustivo al experto en la técnica, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). Comparadas con las emulsiones normales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de pequeñas gotas termodinámicamente estable que se forman espontáneamente.  
55

Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero sin limitar, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, éteres de polioxitileno y oleilo, ésteres de ácido graso y poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de  
60

hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sesquioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DA0750), solos o combinados con cotensioactivos. El cotensioactivo, normalmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial penetrando en la película de tensioactivo y por consiguiente creando una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de tensioactivo. Sin embargo, las microemulsiones se pueden preparar sin usar cotensioactivos y los sistemas de microemulsión autoemulsionantes exentos de alcohol son conocidos en la técnica. La fase acuosa típicamente puede ser, pero sin limitar, agua, una disolución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles, y derivados del etilenglicol. La fase de aceite puede incluir, pero sin limitar, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y triglicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácido graso y glicerilo polioxietilado, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados, aceites vegetales y aceite de silicona.

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

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

#### Liposomas

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

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

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

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

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

- Las formulaciones liposomales han sido el centro de una investigación exhaustiva como modo de liberación de muchos fármacos. Hay cada vez más pruebas de que para la administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas frente a otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen menos efectos secundarios relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, mayor acumulación del fármaco administrado en la diana deseada, y la capacidad de administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrófilos como hidrófobos, a la piel.
- Varias publicaciones han detallado la capacidad de los liposomas para suministrar agentes a la piel, incluyendo ADN de alto peso molecular. Se han administrado a la piel compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADN de alto peso molecular. La mayoría de las aplicaciones se dirigen a la epidermis superior.
- Los liposomas están en dos clases amplias. Los liposomas catiónicos son liposomas con carga positiva que interactúan con moléculas de ADN con carga negativa para formar un complejo estable. El complejo de ADN/liposoma con carga positiva se une a la superficie celular con carga negativa y es internalizado en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen liberando su contenido al citoplasma celular (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).
- Los liposomas que son sensibles al pH o tienen carga negativa, atrapan ADN más que formar complejo con él. Puesto que tanto el ADN como el lípido están cargados de forma similar, se produce repulsión en lugar de formación de complejo. No obstante, algo de ADN es atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH se han usado para suministrar ADN que codifica el gen de la timidina quinasa a monocapas celulares en cultivo. Se detectó la expresión del gen endógeno en las células diana (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).
- Uno de los tipos principales de composiciones de liposomas incluyen fosfolípidos distintos de la fosfatidilcolina natural. Por ejemplo, se pueden formar composiciones de liposomas neutros a partir de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos en general se forman a partir de dimiristoil-fosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente a partir de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición de liposomas está formada por fosfatidilcolina (PC), tal como por ejemplo, PC de soja y PC de huevo. Otro tipo está formado por mezclas de fosfolípidos y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.
- Varios estudios han evaluado el suministro tópico de formulaciones liposomales de fármacos a la piel. La aplicación de liposomas que contenían interferón en la piel de cobayas dio como resultado una reducción de las ampollas del herpes cutáneo, mientras que el suministro de interferón por otra vía (p. ej., como una disolución o una emulsión) no era eficaz (Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Además, un estudio adicional ensayó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación liposomal frente a la administración del interferón usando un sistema acuoso, y concluyó que la formulación liposomal era superior a la administración acuosa (du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).
- Los sistemas liposomales no iónicos también se han examinado para determinar su utilidad en el suministro de fármacos a la piel, en particular sistemas de comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se usaron formulaciones liposomales no iónicas que comprendían Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/éter de estearilo y polioxietileno-10) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/éter de estearilo y polioxietileno-10) para suministrar ciclosporina A en la dermis de la piel de ratón. Los resultados indicaron que dichos sistemas liposomales no iónicos eran eficaces para facilitar la deposición de la ciclosporina A en diferentes capas de la piel (Hu et al. S.T.P. *Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).
- Los liposomas también incluyen liposomas "estéricamente estabilizados", un término que como se usa en la presente memoria, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, dan como resultado tiempos de vida en la circulación potenciados con respecto a liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte del lípido que forma la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glucolípidos, tales como monosialogangliósido  $G_{M1}$ , o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tal como un resto de polietilenglicol (PEG). Sin querer estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree en la técnica que, al menos para los liposomas estéricamente estabilizados que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivatizados con PEG, la semivida en la circulación potenciada de estos liposomas estéricamente estabilizados deriva de una menor captación en las células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu et al., *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).
- Se conocen en la técnica diferentes liposomas que comprenden uno o más glucolípidos. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) describieron la capacidad del monosialogangliósido  $G_{M1}$ , sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar las semividas en la sangre de los liposomas. Estos hallazgos fueron expuestos por Gabizon et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). La patente de EE.UU. n° 4.837.028 y la publicación internacional WO 88/04924, ambos de Allen et al., describen liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido  $G_{M1}$  o un éster sulfato de galactocerebrósido. La patente de EE.UU. n° 5.543.152 (Webb et al.) describe liposomas que comprenden esfingomielina. Los liposomas que comprenden 1,2-*sn*-dimiristoilfosfatidilcolina se describen en la publicación internacional WO 97/13499 (Lim et al.).

En la técnica se conocen muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrófilos y métodos para su preparación. Sunamoto et al. (*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1980, 53, 2778) describían liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C<sub>12</sub>15G, que contiene un resto de PEG. Illum et al. (*FEBS Lett.*, 1984, 167, 79) observaron que el recubrimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos daba como resultado semividas en la sangre potenciadas. Describen fosfolípidos sintéticos modificados por unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (p. ej., PEG) Sears (patentes de EE.UU. n° 4.426.330 y 4.534.899). Klivanov et al. (*FEBS Lett.*, 1990, 268, 235) describían experimentos que demostraban que los liposomas que comprendían fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con PEG o estearato de PEG tenían aumentos significativos de las semividas en la circulación sanguínea. Blume et al. (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1990, 1029, 91) extendieron dichas observaciones a otros fosfolípidos derivatizados con PEG, p. ej., DSPE-PEG, formado por la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Se describen liposomas que tienen restos PEG unidos de forma covalente a su superficie externa en la patente europea n° EP 0 445 131 B1 y la publicación internacional WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen 1-20 por ciento en moles de PE derivatizado con PEG, y los métodos para su uso, los describen Woodle et al. (patentes de EE.UU. n° 5.013.556 y 5.356.633) y Martin et al. (patente de EE.UU. n° 5.213.804 y patente europea n° EP 0496813 B1). Se describen liposomas que comprenden una serie de conjugados de lípido-polímero en la publicación internacional WO 91/05545 y la patente de EE.UU. n° 5.225.212 (ambas de Martin et al.) y en la publicación internacional WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Se describen liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG en la publicación internacional WO 96/10391 (Choi et al.). Las patentes de EE.UU. n° 5.540.935 (Miyazaki et al.) y 5.556.948 (Tagawa et al.) describen liposomas que contienen PEG que pueden estar además derivatizados con restos funcionales en sus superficies.

Se conoce un número limitado de liposomas que comprenden ácidos nucleicos en la técnica. La publicación internacional WO 96/40062 de Thierry et al. describe métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La patente de EE.UU. n° 5.264.221 de Tagawa et al. describe liposomas unidos a proteínas y afirma que el contenido de dichos liposomas puede incluir un ARN antisentido. La patente de EE.UU. n° 5.665.710 de Rahman et al. describe determinados métodos para encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. La publicación internacional WO 97/04787 de Love et al. describe liposomas que comprenden oligonucleótidos antisentido dirigidos al gen raf.

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

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

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

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

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

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad de llevar una carga positiva o negativa, el tensioactivo se clasifica

como anfótero. Los tensioactivos anfóteros incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfátidos.

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

## 5 Potenciadores de la penetración

En una realización, la presente invención usa diferentes potenciadores de la penetración para producir el suministro eficaz de ácidos nucleicos, en particular de oligonucleótidos, en la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes en disolución tanto en formas ionizada como no ionizada. Sin embargo, normalmente solo los fármacos solubles en lípidos o lipófilos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso fármacos no lipófilos pueden cruzar las membranas celulares si la membrana que se va a cruzar se trata con un potenciador de la penetración. Además de añadir la difusión de fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos.

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

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

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

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

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

No tensioactivos no quelantes: Como se usa en la presente memoria, los compuestos potenciadores de la

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

También se pueden añadir agentes que potencian la captación de oligonucleótidos a nivel celular a las composiciones farmacéuticas y otras composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se sabe que los lípidos catiónicos, tales como la lipofectina (Junichi et al, patente de EE.UU. nº 5.705.188), derivados de glicerol catiónicos y moléculas policationicas tales como la polilisina (Lollo et al., solicitud PCT WO 97/30731), también potencian la captación celular de oligonucleótidos.

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

#### Vehículos

Algunas composiciones de la presente invención también incorporan compuestos vehículo en la formulación. Como se usa en la presente memoria, "compuesto vehículo" o "vehículo" se puede referir a un ácido nucleico o análogo del mismo, que es inerte (es decir, no tiene actividad biológica por sí mismo) pero es reconocido como un ácido nucleico por procesos in vivo que reducen la biodisponibilidad del ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo degradando el ácido nucleico biológicamente activo o promoviendo su eliminación de la circulación. La coadministración de un ácido nucleico y un compuesto vehículo, típicamente con un exceso de esta última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperado en el hígado, riñón u otros depósitos extracirculatorios, supuestamente debido a la competición entre el compuesto vehículo y el ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un oligonucleótido parcialmente fosforotioato en tejido hepático se puede reducir cuando se coadministra con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitidílico o ácido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-2,2'-disulfónico (Miyao et al., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5; 115-121; Takakura et al., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

#### Excipientes

A diferencia de un compuesto vehículo, un "vehículo farmacéutico" o "excipiente" es un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la forma de administración planeada en mente, de modo que proporcione el volumen, consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los vehículos farmacéuticos típicos incluyen, pero sin limitar, agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (p. ej., lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliácridatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato sódico, acetato sódico, etc.); disgregantes (p. ej., almidón, glicolato sódico de almidón, etc.); y agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico, etc.).

Los excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionan de forma perjudicial con ácidos nucleicos también se pueden usar para formular las composiciones de la presente invención. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero sin limitar, agua, disoluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Las formulaciones para administración tópica de ácidos nucleicos puede incluir disoluciones acuosas estériles y no estériles, disoluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o disoluciones de los ácidos nucleicos en bases líquidas u oleosas sólidas. Las disoluciones pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionen de forma perjudicial con ácidos nucleicos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitar, agua, disoluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

#### Suministro en pulsos

Los compuestos de la presente invención también se pueden administrar por suministro en pulsos. "Suministro en pulsos" se refiere a una formulación farmacéutica que suministra un primer pulso de fármaco combinado con un



potenciador de la penetración y un segundo pulso de potenciador de la penetración para promover la absorción del fármaco que no se ha absorbido tras la liberación de potenciador de la penetración con el primer pulso.

Una realización de la presente invención es una formulación oral de liberación retardada para la absorción intestinal de fármaco potenciada, que comprende:

5 (a) una primera población de partículas de vehículo que comprenden dicho fármaco y un potenciador de la penetración, en el que dicho fármaco y dicho potenciador de la penetración son liberados en un primer sitio en el intestino; y

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

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

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

Un "efecto del primer paso" que se aplica a los fármacos administrados por vía oral es la degradación debido a la acción del ácido gástrico y diferentes enzimas digestivas. Un medio para mejorar los efectos de eliminación del primer paso es aumentar la dosis del fármaco administrado, compensando de esta forma la proporción de fármaco perdido en la eliminación del primer paso. Aunque esto se puede lograr fácilmente con la administración i.v., por ejemplo, simplemente proporcionando más fármaco a un animal, otros factores influyen en la biodisponibilidad de los fármacos administrados por medios no parenterales. Por ejemplo, un fármaco se puede degradar enzimática o químicamente en el canal alimentario o el torrente sanguíneo y/o puede ser impermeable o permeable frente a diferentes membranas mucosas.  
20

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

Las composiciones farmacéuticas líquidas de oligonucleótidos se pueden preparar mediante la combinación del oligonucleótido con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril exenta de pirógenos o disolución salina. Se pueden incluir opcionalmente otros compuestos terapéuticos.  
30

La presente invención también contempla el uso de composiciones sólidas en partículas. Dichas composiciones preferiblemente comprenden partículas de oligonucleótido que son de tamaño respirable. Dichas partículas se puede preparar, por ejemplo, moliendo el oligonucleótido seco por medios convencionales, por ejemplo con un mortero y mano de mortero, y después pasando la composición en polvo resultante a través de un tamiz de malla n° 400 para separar las partículas grandes y los aglomerados. Una composición sólida en partículas compuesta de un oligonucleótido activo puede contener opcionalmente un dispersante que sirve para facilitar la formación de un aerosol, por ejemplo lactosa.  
35

De acuerdo con la presente invención, las composiciones de oligonucleótidos se pueden aerolizar. La aerolización de partículas líquidas se puede producir por cualquier medio adecuado, tal como un nebulizador. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.501.729. Los nebulizadores son dispositivos disponibles en el comercio que transforman disoluciones o suspensiones en un aerosol de tipo niebla terapéutico por medio de la aceleración de un gas comprimido, típicamente aire y oxígeno, a través de un orificio Venturi estrecho o mediante agitación ultrasónica. Los nebulizadores adecuados incluyen los vendidos por Blairex<sup>®</sup> con los nombres PARI LC PLUS, PARI DURA-NEB 2000, PARI-BABY Size, compresor PARI PRONEB con LC PLUS, sistema compresor/nebulizador PARI WALKHALER, nebulizador reutilizable PARI LC PLUS y PARI LC Jet+<sup>®</sup> Nebulizer.  
45

Las formulaciones de ejemplo para usar en los nebulizadores consisten en un oligonucleótido en un líquido, tal como agua estéril exenta de pirógenos, o disolución salina, en la que el oligonucleótido comprende hasta aproximadamente 40% en p/p de la formulación. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende menos de 20% en p/p. Si se desea, se pueden añadir a la composición aditivos adicionales tales como conservantes (por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo), antioxidantes, y agentes de sabor.  
50

Las partículas sólidas que comprenden un oligonucleótido también se pueden aerolizar usando cualquier generador de aerosol de medicamento en partículas sólidas conocido en la técnica. Dichos generadores de aerosoles producen partículas respirables, como se ha descrito antes, y además producen dosis medidas reproducibles por unidad de volumen del aerosol. Los generadores de aerosoles de partículas sólidas adecuados incluyen insufladores e inhaladores dosificadores. Los inhaladores dosificadores se usan en la técnica y son útiles en la presente invención.  
55

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

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

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

#### Otros componentes

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

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

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

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

50 La formulación de las composiciones terapéuticas y su posterior administración se cree que se basa en la experiencia de los expertos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y la sensibilidad del estado patológico que se va a tratar, durando el curso del tratamiento desde varios días a varios meses, o hasta que se realice la cura o se logre una disminución del estado patológico. Los esquemas de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición. Las

dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de los oligonucleótidos individuales, y en general se puede calcular basándose en las  $CE_{50}$  encontradas eficaces en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosificación es de 0,01 ug a 100 g por kg de peso corporal, y se puede dar una o más veces al día, de forma semanal, mensual o anual, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Los expertos en la técnica pueden calcular fácilmente la frecuencia de repetición para la dosificación basándose en los tiempos de permanencia medidos y las concentraciones de fármaco en los fluidos corporales o tejidos. Después del tratamiento satisfactorio, puede ser conveniente que el paciente siga una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado patológico, en el que el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, en el intervalo de 0,01 ug a 100 g por kg de peso corporal, una o más veces al día, hasta una vez cada 20 años.

## 10 Terapia de Combinación

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

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

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

### Suministro dirigido

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

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

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

En otro aspecto, se proporcionan métodos para dirigir un compuesto que incluyen asociar el compuesto con un agente que dirige la captura del compuesto por uno o más tipos de células. Los agentes de ejemplo incluyen lípidos y estructuras basadas en lípidos tales como liposomas, en general en combinación con un resto que se dirige al órgano o tejido específico tal como, por ejemplo, un anticuerpo, un receptor de superficie celular, un ligando para un receptor de superficie celular, un polisacárido, un fármaco, una hormona, un hapteno, un lípido especial y un ácido

nucleico como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.495.532. La patente de EE.UU. n° 5.399.331, describe el acoplamiento de proteínas a liposomas mediante el uso de un agente de reticulación que tiene al menos un grupo maleimido y una función reactiva con amina. Las patentes de EE.UU. n° 4.885.172, 5.059.421 y 5.171.578, describen proteínas que se unen a liposomas mediante el uso de glicoproteína estreptavidina y recubrimiento de liposomas directores con polisacáridos. Otros agentes directores basados en lípidos incluyen, por ejemplo, micelas y productos cristalinos como se describe en la patente de EE.UU. n° 6.217.886.

En otro aspecto, los agentes directores incluyen microesferas poliméricas porosas que derivan de poliésteres copolímeros y homopolímeros que contienen enlaces éster hidrolizables que son biodegradables, como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.818.542. Los poliésteres típicos incluyen poli(ácido glicólico) (PGA) y poli(ácido láctico) (PLA), y copolímeros de glicólido y L(-lactida) (PGL), que son particularmente adecuados para los métodos y las composiciones de la presente invención, en cuanto que presentan una baja toxicidad humana y son biodegradables. El poliéster u otro polímero, oligómero o copolímero particular usado como matriz polimérica de la microesfera no es crítico y se puede usar una variedad de polímeros dependiendo de la porosidad, consistencia, forma y distribución de tamaños deseados. Otros polímeros o copolímeros biodegradables o bioerosionables incluyen, por ejemplo, gelatina, agar, almidón de maíz, arabinogalactano, albúmina, colágeno, materiales naturales y sintéticos, tales como poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli( $\epsilon$ -caprolactona-CO-ácido láctico), poli( $\epsilon$ -caprolactona-CO-ácido glicólico), poli(ácido  $\beta$ -hidroxibutírico), poli(óxido de etileno), polietileno, poli(2-cianoacrilato de alquilo), (p. ej., metilo, etilo, butilo), hidrogeles tales como poli(metacrilato de hidroxietilo), poliamidas (p. ej., poli(acrilamida), poli(aminoácidos) (es decir, L-leucina, ácido L-aspartico, L-aspartato de  $\beta$ -metilo, L-aspartato de  $\beta$ -bencilo, ácido glutámico), poli(2-hidroxietil-DL-aspartamida), poli(éster urea), poli(L-fenilalanina/etilenglicol/1,6-diisocianatohexano) y poli(metacrilato de metilo). Los polímeros naturales y sintéticos de ejemplo adecuados para la liberación dirigida están disponibles en el comercio o se pueden obtener por reacciones de polimerización por condensación a partir de monómeros, comonomeros u oligómeros adecuados.

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

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

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

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

## 45 Ejemplos

### Ejemplo 1

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

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

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

## 2'-Fluoro-amiditas

## 2'-Fluorodesoxiadenosina-amiditas

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

## 2'-Fluorodesoxiguanosina

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

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

## 2'-Fluorouridina

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

## 2'-Fluorodesoxicidina

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

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

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

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

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

## 2'-O-Metoxietil-5-metiluridina

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

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

La 2'-O-Metoxietil-5-metiluridina (160 g, 0,506 M) se coevaporó con piridina (250 ml) y el residuo seco se disolvió en piridina (1,3 litros). Se añadió una primera parte alícuota de cloruro de dimetoxitritilo (94,3 g, 0,278 M) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una segunda parte alícuota de cloruro de dimetoxitritilo (94,3 g, 0,278 M) y la reacción se agitó durante una hora adicional. Después se añadió metanol (170 ml) para parar la reacción. La HPLC mostró la presencia de aproximadamente 70% de producto. Se evaporó el disolvente y se trituró con CH<sub>3</sub>CN (200 ml). El residuo se disolvió en CHCl<sub>3</sub> (1,5 litros) y se extrajo con 2x500 ml de disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y 2x500 ml de disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. Se obtuvieron 275 g de residuo. El residuo se purificó en una columna de gel de sílice de 3,5 kg empacutada y eluida con EtOAc/hexano/acetona (5:5:1) que contenía Et<sub>3</sub>NH al 0,5%. Las fracciones puras se evaporaron para dar 164 g de producto. Se obtuvieron aproximadamente 20 g adicionales de las fracciones impuras para dar un rendimiento total de 183 g (57%).

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

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

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

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

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

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

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

Se disolvió 2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metilcitidina (85 g, 0,134 M) en DMF (800 ml) y se añadió anhídrido benzoico (37,2 g, 0,165 M) con agitación. Después de agitar durante 3 h, la TLC mostraba que la reacción se había completado en aproximadamente 95%. El disolvente se evaporó y el residuo se destiló azeotrópicamente con MeOH (200 ml). El residuo se disolvió en CHCl<sub>3</sub> (700 ml) y se extrajo con disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x300 ml) y disolución saturada de NaCl (2x300 ml), se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó para dar el residuo (96 g). El residuo se cromatografió en una columna de sílice de 1,5 kg usando EtOAc/hexano (1:1) que contenía Et<sub>3</sub>NH al 0,5% como disolvente de elución. Las fracciones del producto puro se evaporaron para dar 90 g (90%) del compuesto del título.

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

Se disolvió N4-benzoil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metilcitidina (74 g, 0,10 M) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 litro). Se añadieron tetrazol diisopropilamina (7,1 g) y 2-cianoetoxi-tetra-(isopropil)fosfito (40,5 ml, 0,123 M) con agitación en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó durante 20 h a temperatura ambiente (la TLC mostró que la reacción se había completado en un 95%). La mezcla de reacción se extrajo con disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (1x300 ml) y disolución saturada de NaCl (3x300 ml). Los lavados acuosos se volvieron a extraer con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (300

ml), y los extractos se combinaron, se secaron sobre  $MgSO_4$  y se concentraron. El residuo obtenido se cromatografió en una columna de sílice de 1,5 kg usando EtOAc/hexano (3:1) como disolvente de elución. Las fracciones puras del producto se combinaron para dar 90,6 g (87%) del compuesto del título.

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

5 2'-(Dimetilaminooxietoxi)-nucleósido-amiditas

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

5'-O-*terc*-Butildifenilsilil-O<sup>2</sup>-2'-anhidro-5-metiluridina

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

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

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

40 2'-O-([2-ftalimidoxi)etil]-5'-*t*-butildifenilsilil-5-metiluridina

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

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

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

formadoximinoxi)etil]-5-metiluridina en forma de una espuma blanca (1,95 g, 78%).

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

Se disolvió la 5'-O-*terc*-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadoximinoxi)etil]-5-metiluridina (1,77 g, 3,12 mmol) en una disolución de p-toluenosulfonato de piridinio 1 M (PPTS) en MeOH seco (30,6 ml). Se añadió cianoborohidruro sódico (0,39 g, 6,13 mmol) a esta disolución a 10°C en atmósfera inerte. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a 10°C. Después de esto, el recipiente de reacción se retiró del baño de hielo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h, la reacción se siguió por TLC (MeOH al 5% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Se añadió disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (al 5%, 10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x20 ml). La fase de acetato de etilo se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, y se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en una disolución de PPTS 1 M en MeOH (30,6 ml). Se añadió formaldehído (al 20% en p/p, 30 ml, 3,37 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. La mezcla de reacción se enfrió a 10°C en un baño de hielo, se añadió cianoborohidruro sódico (0,39 g, 6,13 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 10°C durante 10 min. Después de 10 min, la mezcla de reacción se retiró del baño de hielo y se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. Se añadió a la mezcla de reacción disolución de NaHCO<sub>3</sub> al 5% (25 ml) y se extrajo con acetato de etilo (2x25 ml). La capa de acetato de etilo se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna ultrarrápida y se eluyó con MeOH al 5% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para dar la 5'-O-*terc*-butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxi)etil]-5-metiluridina en forma de una espuma blanca (14,6 g, 80%).

#### 2'-O-(Dimetilaminooxi)etil)-5-metiluridina

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

#### 5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminooxi)etil)-5-metiluridina

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

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

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

#### 2'-(Aminooxi)etil)-nucleósido-amiditas

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

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

El análogo de 2'-O-aminooxi)etil)-guanosina se puede obtener por 2'-O-alkilación selectiva de la diaminopurina-ribósido. Se pueden adquirir cantidades de multigramos de diaminopurina-ribósido en Schering AG (Berlín) para proporcionar la 2'-O-(2-etilacetil)-diaminopurina-ribósido junto con una cantidad minoritaria del isómero 3'. El 2'-O-(2-etilacetil)-diaminopurina-ribósido se puede resolver y convertir en la 2'-O-(2-etilacetil)guanosina por tratamiento con adenosina desaminasa. (McGee, D. P. C., Cook, P. D., Guinosso, C. J., publicación internacional WO 94/02501 A1 940203.) Los procedimientos de protección convencionales darían la 2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina y la 2-N-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina que se puede reducir para dar la 2-N-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-(2-hidroxietil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina.



Como antes, el grupo hidroxilo se puede desplazar mediante la N-hidroxifalimida por una reacción de Mitsunobu, y se puede formar la fosforamidita del nucleósido protegido de la forma habitual para dar la 2-N-isobutiril-6-O-difenilcarbamoil-2'-O-([2-ftalimidoxi]etil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita].

#### 5 2'-dimetilaminoetoxietoxi (2'-DMAEOE)-nucleósido-amiditas

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

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

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

#### 20 5'-O-Dimetoxitritil-2'-O-[2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil]-5-metil-uridina

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

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

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

#### Ejemplo 2

#### Síntesis de oligonucleótidos

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

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

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

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

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

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

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

5.476.925.

Los fosfotriésteres de oligonucleótidos se preparan como se describe en la patente de EE.UU. 5.023.243.

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

### 5 Ejemplo 3

#### Síntesis de oligonucleósidos

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

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

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

### Ejemplo 4

#### Síntesis de PNA

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

### Ejemplo 5

#### Síntesis de oligonucleótidos quiméricos

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

30 [2'-O-Me]-[2'-desoxi]-[2'-O-Me] Oligonucleótidos fosforotioatos quiméricos

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

45 [2'-O-(2-Metoxietil)]-[2'-desoxi]-(2'-O-(metoxietil))-oligonucleótidos fosforotioatos quiméricos

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

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

50 Los [2'-O-(2-metoxietil-fosfodiéster)-[2'-desoxi fosforotioato]-[2'-O-(metoxietil)-fosfodiéster]-oligonucleótidos

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

5

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

#### Ejemplo 6

##### Aislamiento de oligonucleótidos

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

15

#### Ejemplo 7

##### Síntesis de oligonucleótidos - Formato de placa de 96 pocillos

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

25

Los oligonucleótidos se escindieron del soporte y se desprotegeron con NH<sub>4</sub>OH concentrado a temperatura elevada (55-60°C) durante 12-16 h y después el producto liberado se secó a vacío. Después, el producto seco se volvió a suspender en agua estéril para dar una placa madre, a partir de la cual se diluyen todas las muestras de placa analíticas y de ensayo usando pipetas robóticas.

30

#### Ejemplo 8

##### Análisis de oligonucleótidos - Formato de placa de 96 pocillos

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

35

40

#### Ejemplo 9

##### Cultivo celular y tratamiento de oligonucleótidos

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

45

50

##### Células T-24:

La línea celular de carcinoma de células transicionales de vejiga humanas T-24 se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Las células T-24 se cultivaron de forma rutinaria en medio basal

completo McCoy 5A (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con suero de ternero fetal al 10% (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD), penicilina 100 unidades por ml, y estreptomycinina 100 microgramos por ml (Gibco/Life Technologies, Gaithersburg, MD). Se realizaron pases de las células de forma rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Falcon-Primaria nº 3872) con una densidad de 7000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR.

5

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

Células A549:

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

10

15

Células NHDF:

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

20

Células HEK:

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

25

Células HepG2:

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

30

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

35

Células AML12:

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

40

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

45

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

Hepatocitos primarios de ratón:

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

50

densidad de 10000 células/pocillo para usar en análisis de RT-PCR.

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

5 Células Hep3B:

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

10

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

15 Hepatocitos primarios de conejo:

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

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

Células HeLa:

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

25

30

Células epiteliales mamarias humanas:

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

35

40

Tratamiento con compuestos antisentido:

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

45

La concentración del oligonucleótido usado varía de una línea celular a otra. Para determinar la concentración óptima de oligonucleótido para una línea celular particular, las células se trataron con un oligonucleótido de control positivo en un intervalo de concentraciones. Para células humanas el oligonucleótido de control positivo es ISIS 13920, **TCCGTCATCGCTCCTCAGGG**, SEQ ID NO: 1, un 2'-O-metoxietil-gápmero (los 2'-O-metoxietilos se muestran en negrita) con una cadena principal de fosforotioato que se dirige a H-ras humano. Para células de ratón o rata el oligonucleótido de control positivo es ISIS 15770, **ATGCATTCTGCCCCAAGGA**, SEQ ID NO: 2, un 2'-O-metoxietil-gápmero (los 2'-O-metoxietilo se muestran en negrita) con una cadena principal de fosforotioato que se dirige a c-raf tanto de ratón como de rata. La concentración del oligonucleótido de control positivo que da como

50

resultado 80% de inhibición del ARNm de c-Ha-ras (para ISIS 13920) o c-raf (para ISIS 15770) se usa entonces como concentración de cribado para nuevos oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se alcanza el 80% de inhibición, se usa entonces la concentración más baja del oligonucleótido de control positivo que da como resultado 60% de inhibición del ARNm de H-ras o c-raf, como concentración de cribado de oligonucleótidos en experimentos posteriores para esa línea celular. Si no se alcanza el 60% de inhibición, se considera que esa línea celular particular no es adecuada para los experimentos de transfección de oligonucleótidos. Las concentraciones de oligonucleótidos antisentido usadas en la presente memoria son de 5 nM a 300 nM.

#### Ejemplo 10

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

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

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

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

#### Ejemplo 11

Aislamiento de poli(A)+ ARNm

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

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

#### Ejemplo 12

Aislamiento de ARN total

55 El ARN total se aisló usando el kit RNEASY 96™ y tampones adquiridos en Qiagen Inc. (Valencia CA) siguiendo los procedimientos descritos por el fabricante. Brevemente, para cultivar células en placas de 96 pocillos, se eliminó el

medio de crecimiento de las células y cada pocillo se lavó con 200 µl de PBS frío. Se añadieron 100 µl de tampón RLT a cada pocillo y la placa se agitó enérgicamente durante 20 segundos. Después se añadieron 100 µl de etanol al 70% a cada pocillo y el contenido se mezcló cargando y descargando la pipeta 3 veces. Después las muestras se transfirieron a la placa de 96 pocillos RNEASY 96™ unida a un colector QIAVAC™ equipado con una bandeja de recolección de residuos unida a una fuente de vacío. Se aplicó vacío durante 15 s. Se añadió 1 ml de tampón RW1 a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se volvió a aplicar el vacío durante 15 segundos. Después, se añadió 1 ml de tampón RPE a cada pocillo de la placa RNEASY 96™ y se aplicó el vacío durante un periodo de 15 segundos. Después se repitió el lavado con RPE y se aplicó vacío durante 10 min adicionales. Después se retiró la placa del colector QIAVAC™ y se transfirió en seco sobre toallas de papel. Después, la placa se volvió a unir al colector QIAVAC™ equipado con una rejilla con una rejilla de tubos de recolección que contenía tubos de recolección de 1,2 ml. El ARN después se eluyó añadiendo con pipeta 60 µl de agua en cada pocillo, incubando durante 1 min y después aplicando el vacío durante 30 segundos. La etapa de elución se repitió con 60 µl adicionales de agua.

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

### Ejemplo 13

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

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

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

Los reactivos de la PCR se obtuvieron de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo añadiendo 25 µl de cóctel de PCR (1x tampón A TAQMAN™, MgCl<sub>2</sub> 5,5 mM, 300 µM de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, dUTP 600 µM, 100 nM de cada uno del cebador directo, cebador inverso y sonda, 1,25 unidades de AMPLITAQ GOLD™, y 12,5 unidades de transcriptasa inversa MuLV) a placas de 96 pocillos que contenían 25 µl de disolución de ARN total. La reacción en RT se llevó a cabo por incubación durante 30 min a 48°C. Después de una incubación de 10 min a 95°C para activar la AMPLITAQ GOLD™, se llevaron a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR en dos etapas: 95°C durante 15 segundos (desnaturalización) seguido de 60°C durante 1,5 minutos (reasociación/extensión).

Las cantidades del gen diana obtenidas por la RT-PCR en tiempo real se normalizaron usando el nivel de expresión de GAPDH, un gen cuya expresión es constante, o por cuantificación del ARN total usando RiboGreen™ (Molecular

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

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

10 Las sondas y cebadores para la apolipoproteína B humana se diseñaron para hibridar con una secuencia de apolipoproteína B humana, usando la información de la secuencia publicada (número de acceso en GenBank NM\_000384.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 3). Para la apolipoproteína B humana los cebadores de la PCR eran: cebador directo: TGCTAAAGGCACATATGGCCT (SEQ ID NO: 4) cebador inverso: CTCAGGTTGGACTCTCCATTGAG (SEQ ID NO: 5) y la sonda de la PCR era: FAM-CTTGTCAGAGGGATCCTAACACTGGCCG-TAMRA (SEQ ID NO: 6) donde FAM (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador. Para la GAPDH humana los cebadores de la PCR eran: cebador directo: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (SEQ ID NO: 7) cebador inverso: GAAGATGGTGATGGGATTTC (SEQ ID NO: 8) y la sonda de la PCR era: 5' JOE-CAAGCTTCCCCTCTCAGCC-TAMRA 3' (SEQ ID NO: 9) donde JOE (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador.

20 Las sondas y cebadores para la apolipoproteína B de ratón se diseñaron para hibridar con una secuencia de apolipoproteína B de ratón, usando la información de la secuencia publicada (número de acceso en GenBank M35186, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 10). Para la apolipoproteína B de ratón los cebadores de la PCR eran: cebador directo: CGTGGGCTCCAGCATTCTA (SEQ ID NO: 11) cebador inverso: AGTCATTTCTGCCTTTGCGTC (SEQ ID NO: 12) y la sonda de la PCR era: FAM-CCAATGGTCGGGCACTGCTCAA-TAMRA SEQ ID NO: 13) donde FAM (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador. Para la GAPDH de ratón los cebadores de la PCR eran: cebador directo: GGCAAATTCACGGCACAGT (SEQ ID NO: 14) cebador inverso: GGGTCTCGCTCCTGGAAGAT (SEQ ID NO:15) y la sonda de la PCR era: 5' JOE-AAGGCCGAGAATGGGAAGCTTGTCATC-TAMRA 3' (SEQ ID NO: 16) donde JOE (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador.

#### Ejemplo 14

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

35 Dieciocho horas después del tratamiento antisentido, las monocapas celulares se lavaron dos veces con PBS frío y se lisaron en 1 ml de RNAZOL™ (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX). El ARN total se preparó siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. Se fraccionaron 20 microgramos de ARN total por electroforesis por geles de agarosa al 1,2% que contenían 1,1% de formaldehído usando un sistema de tampón MOPS (AMRESCO, Inc. Solon, OH). El ARN se transfirió del gel a las membranas de nailon HYBOND™-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) mediante transferencia capilar durante la noche usando un sistema de tampón de transferencia Northern/Southern (TEL-TEST "B" Inc., Friendswood, TX). La transferencia de ARN se confirmó por visualización UV. Las membranas se fijaron por reticulación UV usando un reticulador UV STRATALINKER™ UV Crosslinker 2400 (Stratagene, Inc, La Jolla, CA) y después se trataron con la sonda usando disolución de hibridación QUICKHYB™ (Stratagene, La Jolla, CA) usando las recomendaciones del fabricante para condiciones restrictivas.

45 Para detectar la apolipoproteína B humana, se preparó una sonda específica de la apolipoproteína B humana por PCR usando el cebador directo TGCTAAAGGCACATATGGCCT (SEQ ID NO: 4) y el cebador inverso CTCAGGTTGGACTCTCCATTGAG (SEQ ID NO: 5). Para normalizar las variaciones en la eficacia de la carga y transferencia, las membranas se cortaron en tiras y se trataron con sondas para el ARN de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) humana (Clontech, Palo Alto, CA).

50 Para detectar la apolipoproteína B de ratón, se preparó una sonda específica de apolipoproteína B humana por PCR usando el cebador directo CGTGGGCTCCAGCATTCTA (SEQ ID NO: 11) y el cebador inverso AGTCATTTCTGCCTTTGCGTC (SEQ ID NO: 12). Para normalizar las variaciones en la eficacia de la carga y transferencia, las membranas se cortaron en tiras y se trataron con sondas para el ARN de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de ratón (Clontech, Palo Alto, CA).

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



## Ejemplo 15

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

5 Se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando la secuencia publicada (número de acceso en GenBank NM\_000384.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 3). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 1. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 1 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmeros") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos en los que las células HepG2 se trataron con los compuestos de la tabla 1 en concentración 150 nM. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 1

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

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
147780	5'UTR	3	1	CCGCAGGTCCTGGTGGGAAT	40	17
147781	5'UTR	3	21	ACCGAGAAGGGCACTCAGCC	35	18
147782	5'UTR	3	71	GCCTCGGCCTCGCGGCCCTG	67	19
147783	Codón de inicio	3	114	TCCATCGCCAGCTGCGGTGG	N.D.	20
147784	Codificante	3	151	CAGCGCCAGCAGCGCCAGCA	70	21
147785	Codificante	3	181	GCCCGCCAGCAGCAGCAGCA	29	22
147786	Codificante	3	321	CTTGAATCAGCAGTCCCAGG	34	23
147787	Codificante	3	451	CTTCAGCAAGGCTTTGCCCT	N.D.	24
147788	Codificante	3	716	TTTCTGTTGCCACATTGCC	95	25
147789	Codificante	3	911	GGAAGAGGTGTTGCTCCTTG	24	26
147790	Codificante	3	951	TGTGCTACCATCCCATACTT	33	27
147791	Codificante	3	1041	TCAAATGCGAGGCCCATCTT	N.D.	28
147792	Codificante	3	1231	GGACACCTCAATCAGCTGTG	26	29
147793	Codificante	3	1361	TCAGGGCCACCAGGTAGGTG	N.D.	30
147794	Codificante	3	1561	GTAATCTTCATCCCAGTGC	47	31
147795	Codificante	3	1611	TGCTCCATGGTTTGGCCCAT	N.D.	32
147796	Codificante	3	1791	GCAGCCAGTCGCTTATCTCC	8	33
147797	Codificante	3	2331	GTATAGCCAAAGTGGTCCAC	N.D.	34
147798	Codificante	3	2496	CCCAGGAGCTGGAGGTCATG	N.D.	35
147799	Codificante	3	2573	TTGAGCCCTTCTGATGACC	N.D.	36
147800	Codificante	3	2811	ATCTGGACCCCACTCCTAGC	N.D.	37
147801	Codificante	3	2842	CAGACCCGACTCGTGGAAGA	38	38
147802	Codificante	3	3367	GCCCTCAGTAGATTCATCAT	N.D.	39
147803	Codificante	3	3611	GCCATGCCACCCTGTTGGAA	N.D.	40
147804	Codificante	3	3791	AACCCACGTGCCGGAAGTC	N.D.	41
147805	Codificante	3	3841	AGTCCCAGATGCCTTCTGAA	N.D.	42
147806	Codificante	3	4281	ATGTGGTAACGAGCCGAAG	100	43
147807	Codificante	3	4391	GGCGTAGAGACCGATCACAT	25	44
147808	Codificante	3	4641	GTGTTAGGATCCCTCTGACA	N.D.	45
147809	Codificante	3	5241	CCCAGTGATAGCTCTGTGAG	60	46
147810	Codificante	3	5355	ATTTACAGCATATGAGCCCAT	0	47
147811	Codificante	3	5691	CCCTGAACCTTAGCAACAGT	N.D.	48
147812	Codificante	3	5742	GCTGAAGCCAGCCAGCGAT	N.D.	49
147813	Codificante	3	5891	ACAGCTGCCAGTATGTTCT	N.D.	50
147814	Codificante	3	7087	CCAATAAGATTTATAACAA	34	51
147815	Codificante	3	7731	TGGCCTACCAGAGACAGGTA	45	52
147816	Codificante	3	7841	TCATACGTTTAGCCCAATCT	100	53
147817	Codificante	3	7901	GCATGGTCCCAAGGATGGTC	0	54
147818	Codificante	3	8491	AGTGATGGAAGCTGCGATAC	30	55
147819	Codificante	3	9181	ATGAGCATCATGCCTCCAG	N.D.	56
147820	Codificante	3	9931	GAACACATAGCCGAATGCCG	100	57
147821	Codificante	3	10263	GTGGTGCCCTCTAATTTGTA	N.D.	58
147822	Codificante	3	10631	CCCAGAAAGAACCGAACCC	N.D.	59
147823	Codificante	3	10712	TGCCCTGCAGCTTGACTGAA	19	60
147824	Codificante	3	11170	GAAATCCATAAGCTCTTGT	N.D.	61
147825	Codificante	3	12301	AGAAGCTGCCTTCTTCCC	72	62
147826	Codificante	3	12401	TCAGGGTGAGCCCTGTGTGT	80	63
147827	Codificante	3	12471	CTAATGGCCCTTGATAAAC	13	64
147828	Codificante	3	12621	ACGTTATCCTTGAGTCCCTG	12	65
147829	Codificante	3	12741	TATATCCAGGTTTCCCCGG	64	66
147830	Codificante	3	12801	ACCTGGGACAGTACCGTCCC	N.D.	67
147831	3'UTR	3	13921	CTGCCTACTGCAAGGCTGGC	0	68
147832	3'UTR	3	13991	AGAGACCTTCCGAGCCCTGG	N.D.	69
147833	3'UTR	3	14101	ATGATACACAATAAAGACTC	25	70

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

Ejemplo 16

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

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

Tabla 2

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

n° de ISIS	Porcentaje de inhibición		
	50 nM	150 nM	250 nM
147788	54	63	72
147806	23	45	28
147816	25	81	65
147820	10	0	73

20 Ejemplo 17

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

25 Se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B de ratón, usando la secuencia publicada (número de acceso en GenBank M35186, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 10). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 3 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B de ratón en hepatocitos primarios de ratón por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los hepatocitos primarios de ratón se trataron con los compuestos 150 mM de la tabla 3. Los datos son medias de dos experimentos. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

30

Tabla 3

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

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
147475	Codificante	10	13	ATTGTATGTGAGAGGTGAGG	79	71
147476	Codificante	10	66	GAGGAGATTGGATCTTAAGG	13	72
147477	Codificante	10	171	CTTCAAATTGGGACTCTCCT	N.D	73
147478	Codificante	10	211	TCCAGGAATTGAGCTTGTGC	78	74
147479	Codificante	10	238	TTCAGGACTGGAGGATGAGG	N.D	75
147480	Codificante	10	291	TCTCACCTCATGCTCCATT	54	76
147481	Codificante	10	421	TGACTGTCAAGGGTGAGCTG	24	77
147482	Codificante	10	461	GTCCAGCCTAGGAACACTCA	59	78
147483	Codificante	10	531	ATGTCAATGCCACATGTCCA	N.D	79
147484	Codificante	10	581	TTCATCCGAGAAGTTGGGAC	49	80
147485	Codificante	10	601	ATTTGGGACGAATGTATGCC	64	81
147486	Codificante	10	711	AGTTGAGGAAGCCAGATTCA	N.D	82
147487	Codificante	10	964	TTCCCAGTCAGCTTTAGTGG	73	83
147488	Codificante	10	1023	AGCTTGCTTGTTGGGCACGG	72	84
147489	Codificante	10	1111	CCTATACTGGCTTCTATGTT	5	85
147490	Codificante	10	1191	TGAACCTCGTAAGGCAAG	N.D	86
147491	Codificante	10	1216	GAGAAATCCTTCAGTAAGGG	71	87
147492	Codificante	10	1323	CAATGGAATGCTTGCTACTG	68	88
147493	Codificante	10	1441	GCTTCATTATAGGAGGTGGT	41	89
147494	Codificante	10	1531	ACAACCTGGGATAGTGTAGCC	84	90
147495	Codificante	10	1631	GTTAGGACCAGGGATTGTGA	0	91
147496	Codificante	10	1691	ACCATGGAAAACCTGGCAACT	19	92
147497	Codificante	10	1721	TGGGAGGAAAACTTGAATA	N.D	93
147498	Codificante	10	1861	TGGGCAACGATATCTGATTG	0	94
147499	Codificante	10	1901	CTGCAGGGCGTCAGTGACAA	29	95
147500	Codificante	10	1932	GCATCAGACGTGATGTTCCC	N.D	96
147501	Codificante	10	2021	CTTGGTTAAACTAATGGTGC	18	97
147502	Codificante	10	2071	ATGGGAGCATGGAGGTTGGC	16	98
147503	Codificante	10	2141	AATGGATGATGAAACAGTGG	26	99
147504	Codificante	10	2201	ATCAATGCCTCCTGTTGCAG	N.D	100
147505	Codificante	10	2231	GGAAGTGAGACTTTCTAAGC	76	101
147506	Codificante	10	2.281	AGGAAGGAACTCTTGATATT	58	102
147507	Codificante	10	2321	ATTGGCTTCATTGGCAACAC	81	103
147759	Codificante	10	1	AGGTGAGGAAGTTGGAATTC	19	104
147760	Codificante	10	121	TTGTTCCCTGAAGTTGTTAC	N.D	105
147761	Codificante	10	251	GTTTCATGGATTCCCTTCAGGA	45	106
147762	Codificante	10	281	ATGCTCCATTCTCACATGCT	46	107
147763	Codificante	10	338	TGCGACTGTGTCTGATTTC	34	108
147764	Codificante	10	541	GTCCCTGAAGATGTCAATGC	97	109
147765	Codificante	10	561	AGGCCAGTTCATGACCCT	59	110
147766	Codificante	10	761	GGAGCCCACGTGCTGAGATT	59	111
147767	Codificante	10	801	CGTCCTTGAGCAGTGCCCGA	5	112
147768	Codificante	10	1224	CCCATATGGAGAAATCCTTC	24	113
147769	Codificante	10	1581	CATGCCTGGAAGCCAGTGTC	89	114
147770	Codificante	10	1.741	GTGTTGAATCCCTTGAAATC	67	115
147771	Codificante	10	1781	GGTAAAGTTGCCCATGGCTG	68	116
147772	Codificante	10	1841	GTTATAAAGTCCAGCATTGG	78	117
147773	Codificante	10	1931	CATCAGAGTGATGTTCCCT	85	118
147774	Codificante	10	1956	TGGCTAGTTTCAATCCCCTT	84	119
147775	Codificante	10	2002	CTGTCATGACTGCCCTTTAC	52	120
147776	Codificante	10	2091	GCTTGAAGTTCATTGAGAAT	92	121
147777	Codificante	10	2291	TTCCTGAGAAAGGAAGGAAC	N.D	122
147778	Codificante	10	2331	TCAGATATACATTGGCTTCA	14	123

5 Como se muestra en la tabla 3, las SEQ ID No 71, 74, 76, 78, 81, 83, 84, 87, 88, 90, 101, 102, 103, 109, 111, 111, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120 y 121 demostraron al menos 50% de inhibición de la expresión de la

apolipoproteína B de ratón en este ensayo y por lo tanto son preferidas. Los sitios diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "sitios activos" y por lo tanto son sitios preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción.

#### Ejemplo 18

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

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

Tabla 4

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

n° de ISIS	Porcentaje de inhibición		
	50 nM	50 nM	300 nM
147483	56	88	89
147764	48	84	90
147769	3	14	28
147776	0	17	44

15

#### Ejemplo 19

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

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

25

#### Ejemplo 20

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

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

30

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

35

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

Tabla 5

Efectos del tratamiento con ISIS 147764 en los niveles de ARNm de apolipoproteína B, colesterol, lípidos, triglicéridos, enzimas hepáticas y glucosa, en ratones magros y con dieta alta en grasa.

Grupo de tratamiento	Porcentaje de cambio								
	Lipoproteínas					Enzimas hepáticas			
	ARNm	COL.	VLDL	LDL	HDL	TRIG.	AST	ALT	GLUC.
Control magros	-73	-63	no hay cambios	-64	-44	-34	ligera disminución	no hay cambios	no hay cambios
Grupo de dieta alta en grasa	-87	-67	no hay cambios	-87	-65	no hay cambios	ligera disminución	ligero aumento	-28

5

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

10

Ejemplo 21

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

15

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

20

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

25

Ejemplo 22

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

30

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

35

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

40

Ejemplo 23

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

45

Se evaluó en ratones C57BL/6 macho (n=8) que recibían una dieta alta en grasa (60% de kcal de grasa) a lo largo de un periodo de 6 semanas, los efectos de ISIS 147764 en los niveles de colesterol y triglicéridos en el suero. Los animales de control recibieron tratamiento con disolución salina (50 mg/kg). Se administró a los ratones por vía

intraperitoneal cada 3 días (dos veces por semana) 5, 25, 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) o disolución salina (50 mg/kg) durante 6 semanas.

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

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

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

Tabla 6

15 Porcentaje de inhibición de la apolipoproteína B en los niveles de colesterol por ISIS 147764

tiempo	Porcentaje de inhibición			
	Disolución salina	5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg
0 semanas	0	0	0	0
2 semanas	0	5	12	20
6 semanas	0	10	45	55

Ejemplo 24

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

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

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

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

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

Tabla 7

Porcentaje de inhibición de la apolipoproteína B de ratón por ISIS 147764 en los niveles de lipoproteínas comparado con la atorvastatina

Lipoproteína	Tiempo (semanas)	Porcentaje de inhibición				
		disolución salina	Dosis			atorvastatina (20 mg/kg)
			5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	
VLDL	0	0	0	0	0	0
	2	0	25	30	40	15
	6	0	10	-30	15	-5
LDL	0	0	0	0	0	0
	2	0	-30	10	40	10
	6	0	-10	55	90	-10
HDL	0	0	0	0	0	0
	2	0	5	10	10	15
	6	0	10	45	50	20

Ejemplo 25

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

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

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

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

Ejemplo 26

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

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

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

Ejemplo 27

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

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

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

Tabla 8

Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B de ratón en el peso corporal y de órganos

	Porcentaje de cambio			
	Dosis			Atorvastatina
Tejido	5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	20 mg/kg
Peso corporal total	5	5	-4	1
Bazo	10	10	46	10
Hígado	18	70	80	15
Grasa	10	6	-47	7



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

#### Ejemplo 28

- 5 Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B (ISIS 147764) en ratones que no expresan B6.129P-Apoetm1Unc: Animales magros frente a animales alimentados con dieta alta en grasa.

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

La mutación en estos ratones reside en el gen de la apolipoproteína E (ApoE). La función principal de la proteína ApoE es transportar el colesterol y los triglicéridos por todo el cuerpo. Estabiliza la estructura de las lipoproteínas, se une al receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) y proteínas relacionadas, y está presente en una subclase de HDL, proporcionándoles la capacidad para unirse al LDLR. La ApoE es expresada de forma más abundante en el hígado y el cerebro. Se usaron ratones hembra que no expresan B6.129P-Apoetm1Unc (ratones que no expresan ApoE) en los siguientes estudios para evaluar los oligonucleótidos antisentido como potenciales compuestos que reducen los lípidos.

Los ratones hembra que no expresan ApoE tenían edades comprendidas entre 5 y 7 semanas y se pusieron en una dieta normal durante 2 semanas antes de iniciar el estudio. Después, los ratones que no expresan ApoE se alimentaron a voluntad con una dieta con 60% de grasa, con 0,15% de colesterol añadido para inducir dislipidemia y obesidad. Los animales de control se mantuvieron con una dieta alta en grasa sin colesterol añadido. Después de ayunar durante la noche, se administró a los ratones de cada grupo por vía intraperitoneal cada 3 días, disolución salina, 50 mg/kg de un oligonucleótido antisentido de control (ISIS 29837; TCGATCTCCTTTTATGCCCG; SEQ. ID. NO. 124) o 5, 25 ó 50 mg/kg de ISIS 147764 (SEQ ID No: 109) durante 6 semanas.

El oligonucleótido de control es un oligonucleótido quimérico ("gápmeros") de 20 nucleótidos de longitud, compuesto de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.

Al terminar el estudio y 48 h después de las inyecciones finales, los animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de ARNm diana en el hígado por métodos de RT-PCR verificado por análisis de transferencia Northern, los niveles de glucosa, niveles de colesterol y lípidos por métodos de separación de HPLC y niveles de triglicéridos y enzimas hepáticas (realizados por LabCorp Preclinical Services; San Diego, CA). Los datos de los ratones que no expresan ApoE tratados con atorvastatina con una dosis diaria de 20 mg/kg, también se muestran en la tabla para comparar.

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

Tabla 9

Efectos del tratamiento con ISIS 147764 en los niveles de ARNm de apolipoproteína B, colesterol, glucosa, lípidos, triglicéridos y enzimas hepáticas, en ratones que no expresan ApoE.

		Porcentaje de inhibición				
		Dosis				
		Control	5 mg/kg	25 mg/kg	50 mg/kg	atorvastatina (20 mg/kg)
ARNm		0	2	42	70	10
Glucosa		Niveles de glucosa (mg/dl)				
		225	195	209	191	162
Colesterol		Niveles de colesterol (mg/dl)				
		1750	1630	1750	1490	938
Lipoproteína		Niveles de lipoproteínas (mg/dl)				
	HDL	51	49	62	61	42
	LDL	525	475	500	325	250
	VLDL	1190	1111	1194	1113	653
Enzimas hepáticas		Niveles de enzimas hepáticas (U/l)				
	AST	55	50	60	85	75
	ALT	56	48	59	87	76

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

## Ejemplo 29

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

- 15 Se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando la secuencia publicada (número de acceso en GenBank NM\_000384.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 3). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 10. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 10 son oligonucleótidos quiméricos ("gámpmeros") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos en los que las células HepG2 se trataron con los compuestos de la tabla 10 en concentración 150 nM. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 10

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

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
270985	5'UTR	3	199	TTCTCTTCGGCCCTGGCGC	75	124
270986	codificante	3	299	CTCCACTGGAAGCTCTCAGCC	0	125
270987	unión exón: exón	3	359	CCTCCAGCTCAACCTTGCAG	0	126
270988	codificante	3	429	GGTTGAAGCCATACACCTC	6	127
270989	unión exón: exón	3	509	CCAGCTTGAGCTCATACCTG	64	128
270990	codificante	3	584	CCCTCTTGATGTTTCAGGATG	42	129

ES 2 417 879 T3

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
270991	codificante	3	669	GAGCAGTTTCCATACACGGT	21	130
270992	codificante	3	699	CCCTTCCTCGTCTTGACGGT	8	131
270993	codificante	3	756	TTGAAGCGATCACACTGCC	69	132
270994	codificante	3	799	GCCTTTGATGAGAGCAAGTG	51	133
270995	codificante	3	869	TCCTCTTAGCGTCCAGTGTG	40	134
270996	codificante	3	1179	CCTCTCAGCTCAGTAACCAG	0	135
270997	codificante	3	1279	GCACTGAGGCTGTCCACACT	24	136
270998	codificante	3	1419	CGCTGATCCCTCGCCATGTT	1	137
270999	codificante	3	1459	GTTGACCGCGTGGCTCAGCG	76	138
271000	codificante	3	1499	GCAGTCCCTGGGTCCCTGTA	22	139
271001	codificante	3	1859	CCCATGGTAGAATTTGGACA	53	140
271002	unión exón: exón	3	2179	AATCTCGATGAGGTCAGCTG	48	141
271003	codificante	3	2299	GACACCATCAGGAACTTGAC	46	142
271004	codificante	3	2459	GCTCCTCTCCCAAGATGCGG	10	143
271005	codificante	3	2518	GGCACCCATCAGAAGCAGCT	32	144
271006	codificante	3	2789	AGTCCGGAATGATGATGCC	42	145
271007	codificante	3	2919	CTGAGCAGCTTGACTGGTCT	26	146
271008	codificante	3	3100	CCCGTTCAGCGGATAGTAGG	37	147
271010	unión exón: exón	3	3449	TGTCACAACCTTAGGTGGCC	57	148
271011	codificante	3	3919	GTCTGGCAATCCCATGTTCT	51	149
271012	codificante	3	4089	CCCACAGACTTGAAGTGGAG	55	150
271013	codificante	3	4579	GAAGTCCCATCAATCTTGA	19	151
271014	codificante	3	5146	CCCAGAGAGGCCAAGCTCTG	54	152
271015	codificante	3	5189	TGTGTTCCCTGAAGCGGCCA	43	153
271016	codificante	3	5269	ACCCAGAATCATGGCCTGAT	19	154
271017	codificante	3	6049	GGTGCCTGTCTGCTCAGCTG	30	155
271018	codificante	3	6520	ATGTGAACTTGTCTCTCCC	44	156
271019	codificante	3	6639	TATGTCTGCAGTTGAGATAG	15	157
271020	codificante	3	6859	TTGAATCCAGGATGCAGTAC	35	158
271021	codificante	3	7459	GAGTCTCTGAGTCACCTCAC	38	159
271022	codificante	3	7819	GATAGAATATTGCTCTGCAA	100	160
271023	codificante	3	7861	CCCTTGCTCTACCAATGCTT	44	161
271025	codificante	3	8449	TCCATTCCCTATGTCAGCAT	16	162
271026	codificante	3	8589	GACTCCTTCAGAGCCAGCGG	39	163
271027	codificante	3	8629	CCCATGCTCCGTTCTCAGGT	26	164
271028	codificante	3	8829	CGCAGGTCAGCCTGACTAGA	98	165
271030	codificante	3	9119	CAGTTAGAACACTGTGGCCC	52	166
271031	codificante	3	10159	CAGTGTGATGACACTTGATT	49	167
271032	codificante	3	10301	CTGTGGCTAACTTCAATCCC	22	168
271033	codificante	3	10349	CAGTACTGTTATGACTACCC	34	169
271034	codificante	3	10699	CACTGAAGACCGTGTGCTCT	35	170
271035	codificante	3	10811	TCGTAAGTGTCTCCAGAGG	23	171
271036	codificante	3	10839	AAGAGGCCCTCTAGCTGTAA	95	172
271037	codificante	3	11039	AAGACCCAGAATGAATCCGG	23	173
271038	codificante	3	11779	GTCTACCTCAAAGCGTGCAG	29	174
271039	codificante	3	11939	TAGAGGCTAACGTACCATCT	4	175
271041	codificante	3	12149	CCATATCCATGCCACGGTG	37	176
271042	codificante	3	12265	AGTTTCCTCATCAGATTCCC	57	177
271043	codificante	3	12380	CCCAGTGGTACTTGTTGACA	68	178
271044	codificante	3	12526	CCCAGTGGTGCCACTGGCTG	22	179
271045	codificante	3	12579	GTCAACAGTTCCTGGTACAG	19	180

ES 2 417 879 T3

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
271046	codificante	3	12749	CCCTAGTGTATATCCCAGGT	61	181
271048	codificante	3	13009	CTGAAGATTACGTAGCACCT	7	182
271049	codificante	3	13299	GTCCAGCCAACTATACTTGG	54	183
271050	codificante	3	13779	CCTGGAGCAAGCTTCATGTA	42	184
281586	unión exón: exón	3	229	TGGACAGACCAGGCTGACAT	80	185
281587	codificante	3	269	ATGTGTACTIONCCGGAGGTGC	77	186
281588	codificante	3	389	TCTTCAGGATGAAGCTGCAG	80	187
281589	codificante	3	449	TCAGCAAGGCTTTGCCCTCA	90	188
281590	codificante	3	529	CTGCTCCCTTCTGGAATGG	84	189
281591	codificante	3	709	TGCCACATTGCCCTTCTCG	90	190
281592	codificante	3	829	GCTGATCAGAGTTGACAAGG	56	191
281593	codificante	3	849	TACTGACAGGACTGGCTGCT	93	192
281594	codificante	3	889	GATGGCTTCTGCCACATGCT	74	193
281595	codificante	3	1059	GATGTGGATTTGGTGTCTC	76	194
281596	codificante	3	1199	TGACTGCTTCATCACTGAGG	77	195
281597	codificante	3	1349	GGTAGGTGACCACATCTATC	36	196
281598	codificante	3	1390	TCGCAGCTGCTGTGCTGAGG	70	197
281599	unión exón: exón	3	1589	TTCCAATGACCCGCAGAATC	74	198
281600	codificante	3	1678	GATCATCAGTGATGGCTTTG	52	199
281601	codificante	3	1699	AGCCTGGATGGCAGCTTTCT	83	200
281602	codificante	3	1749	GTCTGAAGAAGAACCTCCTG	84	201
281603	codificante	3	1829	TATCTGCCTGTGAAGGACTC	82	202
281604	codificante	3	1919	CTGAGTTCAAGATATTGGCA	78	203
281605	unión exón: exón	3	2189	CTTCCAAGCCAATCTCGATG	82	204
281606	codificante	3	2649	TGCAACTGTAATCCAGCTCC	86	205
281607	unión exón: exón	3	2729	CCAGTTCAGCCTGCATGTTG	84	206
281608	codificante	3	2949	GTAGAGACCAAATGTAATGT	62	207
281609	codificante	3	3059	CGTTGGAGTAAGCGCCTGAG	70	208
281610	unión exón: exón	3	3118	CAGCTCTAATCTGGTGTCCC	69	209
281611	codificante	3	3189	CTGTCCTCTCTGGAGCTC	93	210
281612	codificante	3	3289	CAAGGTCATACTCTGCCGAT	83	211
281613	codificante	3	3488	GTATGGAATAACACCCTTG	70	212
281614	codificante	3	3579	TAAGCTGTAGCAGATGAGTC	63	213
281615	codificante	3	4039	TAGATCTCTGGAGGATTTGC	81	214
281616	codificante	3	4180	GTCTAGAACACCCAGGAGAG	66	215
281617	codificante	3	4299	ACCACAGAGTCAGCCTTCAT	89	216
281618	codificante	3	4511	AAGCAGACATCTGTGGTCCC	90	217
281619	codificante	3	4660	CTCTCCATTGAGCCGGCCAG	96	218
281620	codificante	3	4919	CCTGATATTCAGAACGCAGC	89	219
281621	codificante	3	5009	CAGTGCCTAAGATGTCAGCA	53	220
281622	codificante	3	5109	AGCACCAGGAGACTACACTT	88	221
281623	codificante	3	5212	CCCATCCAGACTGAATTTTG	59	222
281624	codificante	3	5562	GGTCTAGCCGTAGTTTCCC	75	223
281625	codificante	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	94	224
281626	codificante	3	5839	ATGTGCATCGATGGTCATGG	88	225
281627	codificante	3	5869	CCAGAGAGCGAGTTTCCCAT	82	226
281628	codificante	3	5979	CTAGACACGAGATGATGACT	81	227
281629	codificante	3	6099	TCCAAGTCTGGCTGTATTC	83	228

ES 2 417 879 T3

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
281630	codificante	3	6144	CGTCCAGTAAGCTCCACGCC	82	229
281631	codificante	3	6249	TCAACGGCATCTCTCATCTC	88	230
281632	codificante	3	6759	TGATAGTGCTCATCAAGACT	75	231
281633	codificante	3	6889	GATTCTGATTTGGTACTTAG	73	232
281634	codificante	3	7149	CTCTCGATTAACATCATGGAC	81	233
281635	codificante	3	7549	ATACACTGCAACTGTGGCCT	89	234
281636	codificante	3	7779	GCAAGAGTCCACCAATCAGA	68	235
281637	codificante	3	7929	AGAGCCTGAAGACTGACTTC	74	236
281638	codificante	3	8929	TCCCTCATCTGAGAATCTGG	66	237
281640	codificante	3	10240	CAGTGCATCAATGACAGATG	87	238
281641	codificante	3	10619	CCGAACCCTTGACATCTCCT	72	239
281642	codificante	3	10659	GCCTCACTAGCAATAGTTCC	59	240
281643	codificante	3	10899	GACATTTGCCATGGAGAGAG	61	241
281644	codificante	3	11209	CTGTCTCCTACCAATGCTGG	26	242
281645	unión exón: exón	3	11979	TCTGCACTGAAGTCACGGTG	78	243
281646	codificante	3	12249	TCCCGGACCCTCAACTCAGT	76	244
281648	3'UTR	3	13958	GCAGGTCCAGTTCATATGTG	81	245
281649	3'UTR	3	14008	GCCATCCTTCTGAGTTCAGA	76	246
301012	unión exón: exón	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	87	247
301013	5'UTR	3	3	CCCCGCAGGTCCCGGTGGGA	82	248
301014	5'UTR	3	6	CAGCCCCGCAGGTCCCGGTG	88	249
301015	5'UTR	3	23	CAACCGAGAAGGGCACTCAG	53	250
301016	5'UTR	3	35	CCTCAGCGGCAGCAACCGAG	62	251
301017	5'UTR	3	36	TCCTCAGCGGCAGCAACCGA	47	252
301018	5'UTR	3	37	CTCCTCAGCGGCAGCAACCG	45	253
301019	5'UTR	3	39	GGCTCCTCAGCGGCAGCAAC	70	254
301020	5'UTR	3	43	GGCGGGCTCCTCAGCGGCAG	85	255
301021	5'UTR	3	116	GGTCCATCGCCAGCTGCGGT	89	256
301022	Codón de inicio	3	120	GGCGGGTCCATCGCCAGCTG	69	257
301023	Codón de parada	3	13800	TAGAGGATGATAGTAAGTTC	69	258
301024	3'UTR	3	13824	AAATGAAGATTTCTTTTAAA	5	259
301025	3'UTR	3	13854	TATGTGAAAGTTCAATTGGA	76	260
301026	3'UTR	3	13882	ATATAGGCAGTTTGAATTTT	57	261
301027	3'UTR	3	13903	GCTCACTGTATGGTTTTATC	89	262
301028	3'UTR	3	13904	GGCTCACTGTATGGTTTTAT	93	263
301029	3'UTR	3	13908	GGCTGGCTCACTGTATGGTT	90	264
301030	3'UTR	3	13909	AGGCTGGCTCACTGTATGGT	90	265
301031	3'UTR	3	13910	AAGGCTGGCTCACTGTATGG	90	266
301032	3'UTR	3	13917	CTACTGCAAGGCTGGCTCAC	63	267
301033	3'UTR	3	13922	ACTGCCTACTGCAAGGCTGG	77	268
301034	3'UTR	3	13934	TGCTTATAGTCTACTGCCTA	88	269
301035	3'UTR	3	13937	TTCTGCTTATAGTCTACTGC	82	270
301036	3'UTR	3	13964	TTTGGTGCAGGTCCAGTTCA	88	271
301037	3'UTR	3	13968	CAGCTTTGGTGCAGGTCCAG	90	272
301038	3'UTR	3	13970	GCCAGCTTTGGTGCAGGTCC	86	273
301039	3'UTR	3	13974	TGGTGCCAGCTTTGGTGCAG	73	274
301040	3'UTR	3	13978	GCCCTGGTGCAGCTTTGGT	74	275
301041	3'UTR	3	13997	GAGTTCAGAGACCTTCCGAG	85	276
301042	3'UTR	3	14012	AAATGCCATCCTTCTGAGTT	81	277

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
301043	3'UTR	3	14014	AAAAATGCCATCCTTCTGAG	81	278
301044	3'UTR	3	14049	AAAATAACTCAGATCCTGAT	76	279
301045	3'UTR	3	14052	AGCAAATAACTCAGATCCT	90	280
301046	3'UTR	3	14057	AGTTTAGCAAATAACTCAG	80	281
301047	3'UTR	3	14064	TCCCCAAGTTTAGCAAAT	56	282
301048	3'UTR	3	14071	TTCCTCCTCCCCAAGTTTA	67	283
301217	3'UTR	3	14087	AGACTCCATTTATTTGTTCC	81	284

## Ejemplo 30

## Inhibición antisentido de la apolipoproteína B - Desplazamiento sobre gen

- 5 Se llevó a cabo un "desplazamiento sobre gen" en el que se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a las regiones del ARN de la apolipoproteína B humana (número de acceso en GenBank NM\_000384.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 3) que están cerca del sitio diana de las SEQ ID No 224 o 247. Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 11. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 11 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" 10 central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. 15 Las dosis de tratamiento eran 50 nM y 150 nM y están indicadas en la tabla 11. Los datos son medias de dos experimentos. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 11

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

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	SEQ ID NO
308589	unión exón: exón	3	3230	CTTCTGCTTGAGTTACAAAC	94	20	285
308590	unión exón: exón	3	3232	ACCTTCTGCTTGAGTTACAA	98	26	286
308591	unión exón: exón	3	3234	GCACCTTCTGCTTGAGTTAC	92	76	287
308592	unión exón: exón	3	3236	TCGCACCTTCTGCTTGAGTT	96	49	288
308593	unión exón: exón	3	3238	CTTCGCACCTTCTGCTTGAG	80	41	289
308594	unión exón: exón	3	3240	TGCTTCGCACCTTCTGCTTG	88	57	290
308595	unión exón: exón	3	3242	TCTGCTTCGCACCTTCTGCT	82	60	291
308596	unión exón: exón	3	3244	AGTCTGCTTCGCACCTTCTG	94	81	292
308597	unión exón: exón	3	3246	TCAGTCTGCTTCGCACCTTC	91	66	293
308598	unión exón: exón	3	3248	CCTCAGTCTGCTTCGCACCT	85	59	294
308599	unión exón: exón	3	3250	AGCCTCAGTCTGCTTCGCAC	94	79	295
308600	codificante	3	3252	GTAGCCTCAGTCTGCTTCGC	89	72	296
308601	codificante	3	3254	TGGTAGCCTCAGTCTGCTTC	91	63	297
308602	codificante	3	3256	ICATGGTAGCCTCAGTCTGCT	92	83	298
308603	codificante	3	3258	GTCATGGTAGCCTCAGTCTG	97	56	299
308604	codificante	3	3260	ATGTCATGGTAGCCTCAGTC	90	73	300
308605	codificante	3	3262	GAATGTCATGGTAGCCTCAG	81	50	301
308606	codificante	3	3264	TTGAATGTCATGGTAGCCTC	97	54	302
308607	codificante	3	3266	ATTTGAATGTCATGGTAGCC	77	9	303
308608	codificante	3	3268	ATATTTGAATGTCATGGTAG	85	70	304
308609	codificante	3	5582	CAGCCACATGCAGCTTCAGG	96	78	305
308610	codificante	3	5584	ACCAGCCACATGCAGCTTCA	90	40	306
308611	codificante	3	5586	TTACCAGCCACATGCAGCTT	95	59	307
308612	codificante	3	5588	GGTTACCAGCCACATGCAGC	90	75	308
308613	codificante	3	5590	TAGGTTACCAGCCACATGCA	87	43	309
308614	codificante	3	5592	TTTAGGTTACCAGCCACATG	92	74	310
308615	codificante	3	5594	CTTTTAGGTTACCAGCCACA	85	45	311
308616	codificante	3	5596	TCCTTTTAGGTTACCAGCCA	81	39	312
308617	codificante	3	5598	GCTCCTTTTAGGTTACCAGC	87	77	313
308618	codificante	3	5600	AGGCTCCTTTTAGGTTACCA	77	61	314
308619	codificante	3	5602	GTAGGCTCCTTTTAGGTTAC	74	69	315
308620	codificante	3	5604	TGGTAGGCTCCTTTTAGGTT	88	69	316
308621	codificante	3	5606	TTTGGTAGGCTCCTTTTAGG	91	56	317

5 Como se muestra en las tablas 10 y 11, las SEQ ID No 124, 128, 129, 132, 133, 134, 138, 140, 141, 142, 144, 145, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 163, 165, 166, 167, 169, 170, 172, 176, 177, 178, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228,

229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, y 317 demostraron al menos 30% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B humana en este ensayo y por lo tanto son preferidas. Son más preferidas las SEQ ID No 224, 247 y 262. Las regiones diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el presente documento "segmentos diana preferidos" y por lo tanto son sitios preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción. Estos segmentos diana preferidos se muestran en la tabla 18. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos mostrados en las tablas 10 y 11. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en el ácido nucleico diana particular, al que se une el oligonucleótido. También se muestran en la tabla 18 las especies en las que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Ejemplo 31

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

Se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando la secuencia publicada (número de acceso en GenBank M14162.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 318). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 12. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 12 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos en los que las células HepG2 se trataron con los compuestos de la tabla 12 en concentración 150 nM. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 12

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

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
271009	codificante	318	3121	GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC	75	319
271024	codificante	318	8031	GCTCACTGTTTCAGCATCTGG	27	320
271029	codificante	318	8792	TGAGAATCTGGGCGAGCCC	N.D.	321
271040	codificante	318	11880	GTCCTTCATATTTGCCATCT	0	322
271047	codificante	318	12651	CCTCCCTCATGAACATAGTG	32	323
281639	codificante	318	9851	GACGTCAGAACCTATGATGG	38	324
281647	codificante	318	12561	TGAGTGAGTCAATCAGCTTC	73	325

Ejemplo 32

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

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



Tabla 13

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

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	SEQ ID NO
308622	codificante	318	3104	GCCTTCTGCTTGAGTTACAA	87	25	326
308623	codificante	318	3106	GCGCCTTCTGCTTGAGTTAC	71	62	327
308624	codificante	318	3108	TCGCGCCTTCTGCTTGAGTT	89	69	328
308625	codificante	318	3110	CTTCGCGCCTTCTGCTTGAG	83	64	329
308626	codificante	318	3116	AGTCTGCTTCGCGCCTTCTG	94	38	330
308627	codificante	318	3118	TCAGTCTGCTTCGCGCCTTC	89	67	331
308628	codificante	318	3120	CCTCAGTCTGCTTCGCGCCT	92	61	332
308629	codificante	318	3122	AGCCTCAGTCTGCTTCGCGC	95	77	333

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

## Ejemplo 33

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

Se diseñó otra serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando la secuencia publicada (el complemento de los nucleótidos 39835 a 83279 de la secuencia con número de acceso a GenBank NT\_022227.9, que representa una secuencia genómica, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 334). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 14. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 14 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana en células HepG2 por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos son medias de dos experimentos en los que las células HepG2 se trataron con los oligonucleótidos 150 nM de la tabla 14. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

## 30 Tabla 14

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

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
301049	unión intrón:exón	334	904	TCTGTAAGACAGGAGAAAGA	41	335
301050	unión intrón:exón	334	913	ATTCCTCTTCTGTAAGACA	22	336
301051	unión exón:intrón	334	952	GATGCCTTACTTGGACAGAC	27	337
301052	intrón	334	1945	AGAAATAGCTCTCCAAGGA	13	338
301053	unión intron:exón	334	1988	GTCGCATCTTCTAACGTGGG	45	339

ES 2 417 879 T3

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
301054	unión exón:intrón	334	2104	TCCTCCATACCTTGCAATTG	0	340
301055	intrón	334	2722	TGGCTCATGTCTACCATATT	49	341
301056	intrón	334	2791	CAGTTGAAATGCAGCTAATG	35	342
301057	intrón	334	3045	TGCAGACTAGGAGTGAAAGT	30	343
301058	intrón	334	3117	AGGAGGATGTCCTTTTATTG	27	344
301059	intrón	334	3290	ATCAGAGCACCAAAGGGAAT	12	345
301060	unión intrón:exón	334	3381	CCAGCTCAACCTGAGAATTC	17	346
301061	unión exón:intrón	334	3527	CATGACTTACCTGGACATGG	52	347
301062	intrón	334	3566	CCTCAGCGGACACACACACA	21	348
301063	intrón	334	3603	GTCACATCCGTGCCTGGTGC	41	349
301064	intrón	334	3864	CAGTGCCTCTGGGACCCAC	60	350
301065	intrón	334	3990	AGCTGCAGTGGCCGATCAGC	50	351
301066	intrón	334	4251	GACCTCCCCAGCCACGTGGA	61	352
301067	intrón	334	4853	TCTGATCACCATACATTACA	45	353
301068	intrón	334	5023	ATTTCCCACTGGGTACTCTC	44	354
301069	intrón	334	5055	GGCTGAAGCCCATGCTGACT	44	355
301070	intrón	334	5091	GTTGGACAGTCATTCTTTTG	38	356
301071	intrón	334	5096	CACTTGTTGGACAGTCATTC	48	357
301072	intrón	334	5301	ATTTTAAATTACAGTAGATA	43	358
301073	intrón	334	5780	CTGTTCTCCACCCATATCAG	37	359
301074	unión intrón:exón	334	6353	GAGCTCATACCTGTCCCAGA	75	360
301075	intrón	334	6534	TTCAAGGGCCACTGCTATCA	52	361
301076	intrón	334	6641	CCAGTATTTACGCCAATCC	36	362
301077	intrón	334	6661	GGCAGGAGGAACCTCGGGCA	55	363
301078	intrón	334	6721	TTTTAAAATTAGACCCAACC	22	364
301079	intrón	334	6727	TGACTGTTTTAAAATTAGAC	20	365
301080	intrón	334	6788	CCCAGCAAACACAGGTGAAG	25	366
301081	intrón	334	7059	GAGTGTGGTCTTGCTAGTGC	46	367
301082	intrón	334	7066	CTATGCAGAGTGTGGTCTTG	41	368
301083	intrón	334	7189	AGAAGATGCAACCACATGTA	29	369
301084	unión intrón:exón	334	7209	ACACGGTATCCTATGGAGGA	49	370
301085	unión exón:intrón	334	7365	TGGGACTTACCATGCCTTTG	11	371
301086	intrón	334	7702	GGTTTTGCTGCCCTACATCC	30	372
301087	intrón	334	7736	ACAAGGAGTCCTTGTGCAGA	40	373
301088	intrón	334	8006	ATGTTCACTGAGACAGGCTG	41	374
301089	intrón	334	8215	GAAGGTCCATGGTTCATCTG	0	375
301090	intrón	334	8239	ATTAGACTGGAAGCATCCTG	39	376
301091	intrón	334	8738	GAGATTGGAGACGAGCATT	35	377
301092	unión exón:intrón	334	8881	CATGACCTACTTGTAGGAGA	22	378
301093	intrón	334	9208	TGGATTTGGATACACAAGTT	42	379
301094	intrón	334	9244	ACTCAATATATATTCATTGA	22	380
301095	intrón	334	9545	CAAGGAAGCACACCATGTCA	38	381
301096	unión intrón:exón	334	9563	ATACTTATTCCTGGTAACCA	24	382
301097	intrón	334	9770	GGTAGCCAGAACACCAGTGT	50	383
301098	intrón	334	9776	ACTAGAGGTAGCCAGAACAC	34	384

ES 2 417 879 T3

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
301099	intrón	334	10149	ACCACCTGACATCACAGGTT	24	385
301100	intrón	334	10341	TACTGTGACCTATGCCAGGA	55	386
301101	intrón	334	10467	GGAGGTGCTACTGTTGACAT	42	387
301102	intrón	334	10522	TCCAGACTTGTCTGAGTCTA	47	388
301103	intrón	334	10547	TCTAAGAGGTAGAGCTAAAG	7	389
301104	intrón	334	10587	CCAGAGATGAGCAACTTAGG	38	390
301105	intrón	334	10675	GGCCATGTAAATTGCTCATC	7	391
301106	intrón	334	10831	AAAGAACTATCCTGTATTC	12	392
301107	unión intrón:exón	334	10946	TTCTTAGTACCTGGAAGATG	23	393
301108	unión exón:intrón	334	11166	CATTAGATACCTGGACACCT	29	394
301109	intrón	334	11337	GTTTCATGGAACCTCAGCGCA	44	395
301110	intrón	334	11457	CTGGAGAGCACCTGCAATAG	35	396
301111	intrón	334	11521	TGAAGGGTAGAGAAATCATA	9	397
301112	unión exón:intrón	334	12111	GGAAACTCACTTGTTGACCG	25	398
301113	intrón	334	12155	AGGTGCAAGATGTTCTCTG	46	399
301114	intrón	334	12162	TGCACAGAGGTGCAAGATGT	16	400
301115	intrón	334	12221	CACAAGAGTAAGGAGCAGAG	39	401
301116	intrón	334	12987	GATGGATGGTGAGAAATTAC	33	402
301117	intrón	334	13025	TAGACAATTGAGACTCAGAA	39	403
301118	intrón	334	13057	ATGTGCACACAAGGACATAG	33	404
301119	intrón	334	13634	ACATACAAATGGCAATAGGC	33	405
301120	intrón	334	13673	TAGGCAAAGGACATGAATAG	30	406
301121	codificante	334	14448	TTATGATAGCTACAGAATAA	29	407
301122	unión exón:intrón	334	14567	CTGAGATTACCCGCAGAATC	32	408
301123	intrón	334	14587	GATGTATGTATATAAAAAGA	26	409
301124	unión intrón:exón	334	14680	TTTCCAATGACCTGCATTGA	48	410
301125	intrón	334	15444	AGGGATGGTCAATCTGGTAG	57	411
301126	intrón	334	15562	GGCTAATAAATAGGGTAGTT	22	412
301127	intrón	334	15757	TCCTAGAGCACTATCAAGTA	41	413
301128	unión intrón:exón	334	15926	CCTCCTGGTCCTGCAGTCAA	56	414
301129	intrón	334	16245	CATTTGCACAAGTGTGTTGTT	35	415
301130	intrón	334	16363	CTGACACACCATGTTATTAT	10	416
301131	unión intrón:exón	334	16399	CTTTTTCAGACTAGATAAGA	0	417
301132	unión exón:intrón	334	16637	TCACACTTACCTCGATGAGG	29	418
301133	intrón	334	17471	AAGAAAATGGCATCAGGTTT	13	419
301134	unión intrón:exón	334	17500	CCAAGCCAATCTGAGAAAGA	25	420
301135	unión exón:intrón	334	17677	AAATACACACCTGCTCATGT	20	421
301136	unión exón:intrón	334	17683	CTTCACAAATACACACCTGC	20	422
301137	intrón	334	18519	AGTGAAGTTTGGTCTCATT	41	423
301138	intrón	334	18532	TTGCTAGCTTCAAAGTGGA	44	424
301139	intrón	334	18586	TCAAGAATAAGCTCCAGATC	41	425
301140	intrón	334	18697	GCATACAAGTCACATGAGGT	34	426

ES 2 417 879 T3

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
301141	intrón	334	18969	TACAAGGTGTTTCTTAAGAA	38	427
301142	intrón	334	19250	ATGCAGCCAGGATGGGCCTA	54	428
301143	unión intrón:exón	334	19340	TTACCATATCCTGAGAGTTT	55	429
301144	intrón	334	19802	GCAAAGGTAGAGGAAGGTAT	32	430
301145	intrón	334	19813	AAGGACCTTCAGCAAAGGTA	36	431
301146	intrón	334	20253	CATAGGAGTACATTTATATA	23	432
301147	intrón	334	20398	ATTATGATAAAATCAATTTT	19	433
301148	intrón	334	20567	AGAAATTTCACTAGATAGAT	31	434
301149	intrón	334	20647	AGCATATTTTGATGAGCTGA	44	435
301150	intrón	334	20660	GAAAGGAAGGACTAGCATAT	39	436
301151	unión intrón:exón	334	20772	CCTCTCCAATCTGTAGACCC	28	437
301152	intrón	334	21316	CTGGATAACTCAGACCTTTG	40	438
301153	intrón	334	21407	AGTCAGAAAACAACCTATTC	11	439
301154	unión intrón:exón	334	21422	CAGCCTGCATCTATAAGTCA	31	440
301155	unión exón:intrón	334	21634	AAAGAATTACCCTCCACTGA	33	441
301156	intrón	334	21664	TCTTTCAAACCTGGCTAGGCA	39	442
301157	intrón	334	21700	GCCTGGCAAATCTGCAGG	37	443
301158	intrón	334	22032	CTACCTCAAATCAATATGTT	28	444
301159	intrón	334	22048	TGCTTTACCTACCTAGCTAC	36	445
301160	intrón	334	22551	ACTTGTGTGTCTCACTCAA	49	446
301161	intrón	334	22694	ATGCATTCCCTGACTAGCAC	34	447
301162	intrón	334	22866	CATCTCTGAGCCCCTTACCA	24	448
301163	intrón	334	22903	GCTGGGCATGCTCTCTCCCC	51	449
301164	intrón	334	22912	GCTTTGCGAGCTGGGCATGC	55	450
301165	intrón	334	23137	ACTCCTTTCTATACCTGGCT	47	451
301166	intrón	334	23170	ATTCTGCCTCTTAGAAAGTT	38	452
301167	intrón	334	23402	CCAAGCCTCTTACTGGGCT	29	453
301168	intrón	334	23882	CACTCATGACCAGACTAAGA	35	454
301169	intrón	334	23911	ACCTCCCAGAAGCCTTCCAT	22	455
301170	intrón	334	24184	TTCATATGAAATCTCCTACT	40	456
301171	intrón	334	24425	TATTTAATTTACTGAGAAAC	7	457
301172	unión intrón:exón	334	24559	TAATGTGTTGCTGGTGAAGA	35	458
301173	unión exón:intrón	334	24742	CATCTCTAACCTGGTGTCCC	21	459
301174	intrón	334	24800	GTGCCATGCTAGGTGGCCAT	37	460
301175	intrón	334	24957	AGCAAATGGGATCTGTGCT	29	461
301176	intrón	334	24991	TCTGGAGGCTCAGAAACATG	57	462
301177	intrón	334	25067	TCAAGACAGGAGCCACCTA	40	463
301178	intrón	334	25152	AGGATTCCCAAGACTTTGGA	38	464
301179	unión intrón:exón	334	25351	CAGCTCTAATCTAAAGACAT	22	465
301180	unión exón:intrón	334	25473	GAATACTCACCTTCTGCTTG	6	466
301181	intrón	334	26047	ATCTCTGTCTCATCTTC	28	467
301182	intrón	334	26749	CCAACCTCCCCTTTCTTTGT	37	468
301183	intrón	334	26841	TCTGGGCCAGGAAGACACGA	68	469
301184	intrón	334	27210	TATTGTGTGCTGGGCACTGC	52	470

ES 2 417 879 T3

n° de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
301185	unión intrón:exón	334	27815	TGCTTCGCACCTGGACGAGT	51	471
301186	unión exón:intrón	334	28026	CCTTCTTTACCTTAGGTGGC	37	472
301187	intrón	334	28145	GCTCTCTGCCACTCTGAT	47	473
301188	intrón	334	28769	AACTTCTAAAGCCAACATTC	27	474
301189	unión intrón:exón	334	28919	TGTGTCACAACATATGGTAAA	63	475
301190	unión exón:intrón	334	29095	AGACACATACCATAATGCCA	22	476
301191	unión intrón:exón	334	29204	TTCTCTTCATCTGAAAATAC	21	477
301192	intrón	334	29440	TGAGGATGTAATTAGCACTT	27	478
301193	unión intrón:exón	334	29871	AGCTCATTGCCTACAAAATG	31	479
301194	intrón	334	30181	GTTCTCATGTTTACTAATGC	40	480
301195	intrón	334	30465	GAATTGAGACAACCTTGATTT	26	481
301196	unión intrón:exón	334	30931	CCGGCCATCGCTGAAATGAA	54	482
301197	unión exón:intrón	334	31305	CATAGCTCACCTTGACATT	28	483
301198	intrón	334	31325	CGGTGCACCCTTTACCTGAG	28	484
301199	unión intrón:exón	334	31813	TCTCCAGATCCTAACATAAA	19	485
301200	intrón	334	39562	TTGAATGACACTAGATTTTC	37	486
301201	intrón	334	39591	AAAATCCATTTTCTTTAAAG	12	487
301202	intrón	334	39654	CAGCTCACACTTATTTTAAA	7	488
301203	unión intrón:exón	334	39789	GTTCCAAAACGTATAGGA	36	489
301204	unión exón:intrón	334	39904	AGCTCCATACTGAAGTCCTT	37	490
301205	intrón	334	39916	CAATTCAATAAAAAGCTCCAT	31	491
301206	intrón	334	39938	GTTTTCAAAGGTATAAGGT	28	492
301207	unión intrón:exón	334	40012	TTCCATTCCCTGAAAGCAG	13	493
301208	unión exón:intrón	334	40196	TGGTATTACCTGAGGGCTG	21	494
301209	intrón	334	40412	ATAAATAATAGTGCTGATGG	39	495
301210	intrón	334	40483	CTATGGCTGAGCTTGCCTAT	33	496
301211	intrón	334	40505	CTCTCTGAAAAATATACCCT	17	497
301212	intrón	334	40576	TTGATGTATCTCATCTAGCA	41	498
301213	intrón	334	40658	TAGAACCATGTTTGGTCTTC	35	499
301214	intrón	334	40935	TTTCTTTTATCACATGCCC	29	500
301215	intrón		41066	TATAGTACATAAAAACCTTCA	1	501
301216	unión intrón:exón	334	41130	CTGGAGAGGACTAAACAGAG	49	502

Como se muestra en la tabla 14, las SEQ ID No 335, 339, 341, 342, 343, 347, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 367, 368, 370, 372, 373, 374, 376, 377, 379, 381, 383, 384, 386, 387, 388, 390, 395, 396, 399, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 408, 410, 411, 413, 414, 415, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 434, 435, 436, 438, 440, 441, 442, 443, 445, 446, 447, 449, 450, 451, 452, 454, 456, 458, 460, 462, 463, 464, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 475, 479, 480, 482, 486, 489, 490, 491, 495, 496, 498, 499, y 502 demostraron al menos 30% de inhibición de la expresión de la apolipoproteína B humana en este ensayo, y por lo tanto son preferidas. Las regiones diana de los que estas secuencias preferidas son complementarias se denominan en el

presente documento "segmentos diana preferidos" y por lo tanto son preferidos para dirigir los compuestos de la presente descripción. Estos segmentos diana preferidos se muestran en la tabla 18. Las secuencias representan el complemento inverso de los compuestos antisentido preferidos mostrados en la tabla 14. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en el ácido nucleico diana particular, al que se une el oligonucleótido. También se muestran en la tabla 18 las especies en las que se encontraron cada uno de los segmentos diana preferidos.

Ejemplo 34

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

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

Tabla 15

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

nº de ISIS	REGIÓN	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
301218	3'UTR	503	484	ACATTTTATCAATGCCCTCG	23	504
301219	3'UTR	503	490	GCCAGAACATTTTATCAATG	35	505
301220	3'UTR	503	504	AGAGGTTTTGCTGTGCCAGA	51	506
301221	3'UTR	503	506	CTAGAGGTTTTGCTGTGCCA	61	507
301222	3'UTR	503	507	TCTAGAGGTTTTGCTGTGCC	14	508
301223	3'UTR	503	522	AATCACACTATGTGTTCTAG	26	509
301224	3'UTR	503	523	AAATCACACTATGTGTTCTA	33	510
301225	3'UTR	503	524	TAAATCACACTATGTGTTCT	3	511
301226	3'UTR	503	526	CTTAAATCACACTATGTGTT	39	512
301227	3'UTR	503	536	TATTCTGTTACTTAAATCAC	23	513

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

Ejemplo 35

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

Se diseñó una serie de compuestos antisentido para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B humana, usando secuencias publicadas (número de acceso en GenBank NM\_000384.1, incorporada en el presente documento como SEQ ID NO: 3). Los compuestos se muestran en la Tabla 16. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 16 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud. La región de "hueco" consiste en 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" compuestas de 2'-

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

Tabla 16

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

nº de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	estructura del hueco	SEQ ID NO
308631	3	5589	<b>AGGTTACCAGCCACATGCAG.</b>	94	74	0~10~10	224
308632	3	3249	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCACC</b>	97	41	0~10~10	247
308634	3	5589	<b>AGGTTACCAGCCACATGCAG</b>	67	45	10~10~0	224
308635	3	3249	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCACC</b>	93	69	10~10~0	247
308637	3	5589	<b>AGGTTACCAGCCACATGCAG</b>	95	79	1~10~9	224
308638	3	3249	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCACC</b>	94	91	1~10~9	247
308640	3	5589	<b>AGGTTACCAGCCACATGCAG</b>	96	76	2~10~8	224
308641	3	3249	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCACC</b>	89	77	2~10~8	247
308643	3	5589	<b>AGGTTACCAGCCACATGCAG.</b>	96	56	3~10~7	224
308644	3	3249	<b>GCCTCAGTCTCCTTCGCACC:</b>	93	71	3~10~7	247
308646	3	5589	<b>AGGTTACCAGCCACATGCAG</b>	76	50	4~10~6	224
308647	3	3249	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCACC</b>	86	53	4~10~6	247

308649	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	91	68	6~10~4	224
308650	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	94	74	6~10~4	247
308652	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	95	73	7~10~3	224
308653	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	89	73	7~10~3	247
308655	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	83	84	8~10~2	224
308656	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	97	37	8~10~2	247
308658	3	5589	AGGTTACCAGCCACATGCAG	78	86	9~10~1	224
308659	3	3249	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	93	70	9~10~1	247
308660	3	3254	TGGTAGCCTCAGTCTGCTTC	92	72	2~10~8	514
308662	3	3254	TGGTAGCCTCAGTCTGCTTC	83	76	8~10~2	514

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

#### Ejemplo 36

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

Se diseñaron una serie de compuestos antisentido basados en las SEQ ID No 319 y 515, con variaciones en la estructura del hueco. Los compuestos se muestran en la Tabla 17. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el compuesto. Todos los compuestos de la tabla 17 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de 20 nucleótidos de longitud. La región de "hueco" consiste en 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada por ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" compuestas de 2'-metoxietil (2'-MOE)nucleótidos. El número de 2'-MOE-nucleótidos en cada lado del hueco varía de modo que el número total de 2'-MOE-nucleótidos es siempre igual a 10 y la longitud total del oligonucleótido quimérico es 20 nucleótidos. La estructura exacta de cada oligonucleótido se designa en la tabla 17 como "estructura del hueco" y los 2'-desoxinucleótidos están en negrilla. Una designación de 8-10-2, por ejemplo, indica que los primeros (los más 5') 8 nucleótidos y los últimos (los más 3') 2 nucleótidos son 2'-MOE-nucleótidos y los 10 nucleótidos en el hueco son 2'-desoxinucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de



todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los datos mostrados en la tabla 17 son medias de tres experimentos en los que se trataron células HepG2 con oligonucleótidos antisentido de la presente descripción con dosis de 50 nM y 150 nM. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

Tabla 17

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

nº de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB. 150 nM	% de INHIB. 50 nM	estructura del hueco	SEQ ID NO
308630	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	89	69	0~10~10	319
30863	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	83	66	10~10~0	319
308636	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	91	81	1~10~9	319
308639	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	94	86	2~10~8	319
308642	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	95	85	3~10~7	319
308645	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	98	57	4~20~6	319
308648	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	89	78	6~10~4	319
308651	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	88	87	7~10~3	319
308654	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	90	81	8~10~2	319
308657	318	3121	<b>GCCTCAGTCTGCTTCGCGCC</b>	78	61	9~10~1	319
308661	318	3116	<b>AGTCTGCTTCGCGCCTTCTG</b>	91	70	2~10~8	515
308663	318	3116	<b>AGTCTGCTTCGCGCCTTCTG</b>	84	44	8~10~2	515

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

Tabla 18

20 Secuencia y posición de los segmentos diana preferidos identificados en la apolipoproteína B.

ID DE SITIO	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO
187342	3	199	GCGCCAGGGCCGAAGAGGAA	124	<i>H. sapiens</i>	516
187346	3	509	CAGGTATGAGCTCAAGCTGG	128	<i>H. sapiens</i>	517
187347	3	584	CATCCTGAACATCAAGAGGG	129	<i>H. sapiens</i>	518
187350	3	756	GGGCAGTGTGATCGCTTCAA	132	<i>H. sapiens</i>	519
187351	3	799	CACTTGCTCTCATCAAAGGC	133	<i>H. sapiens</i>	520

ES 2 417 879 T3

ID DE SITIO	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO
187352	3	869	CACACTGGACGCTAAGAGGA	134	<i>H. sapiens</i>	521
187356	3	1459	CGCTGAGCCACGCGGTCAAC	138	<i>H. sapiens</i>	522
187358	3	1859	TGTCCAAATTCTACCATGGG	140	<i>H. sapiens</i>	523
187359	3	2179	CAGCTGACCTCATCGAGATT	141	<i>H. sapiens</i>	524
187360	3	2299	GTCAAGTTCCTGATGGTGTC	142	<i>H. sapiens</i>	525
187362	3	2518	AGCTGCTTCTGATGGGTGCC	144	<i>H. sapiens</i>	526
187363	3	2789	GGGCATCATCATTCCGACT	145	<i>H. sapiens</i>	527
187365	3	3100	CCTACTATCCGCTGACCGGG	147	<i>H. sapiens</i>	528
187367	3	3449	GGGCCACCTAAGTTGTGACA	148	<i>H. sapiens</i>	529
187368	3	3919	AGAACATGGGATTGCCAGAC	149	<i>H. sapiens</i>	530
187369	3	4089	CTCCACTTCAAGTCTGTGGG	150	<i>H. sapiens</i>	531
187371	3	5146	CAGAGCTTGGCCTCTCTGGG	152	<i>H. sapiens</i>	532
187372	3	5189	TGGCCGCTTCAGGGAACACA	153	<i>H. sapiens</i>	533
187374	3	6049	CAGCTGAGCAGACAGGCACC	155	<i>H. sapiens</i>	534
187375	3	6520	GGGAGAGACAAAGTTTCACAT	156	<i>H. sapiens</i>	535
187377	3	6859	GTAATGCATCCTGGATTCAA	158	<i>H. sapiens</i>	536
187378	3	7459	GTGAGGTGACTCAGAGACTC	159	<i>H. sapiens</i>	537
187379	3	7819	TTGCAGAGCAATATTCTATC	160	<i>H. sapiens</i>	538
187380	3	7861	AAGCATTGGTAGAGCAAGGG	161	<i>H. sapiens</i>	539
187383	3	8589	CCGCTGGCTCTGAAGGAGTC	163	<i>H. sapiens</i>	540
187385	3	8829	TCTAGTCAGGCTGACCTGCG	165	<i>H. sapiens</i>	541
187387	3	9119	GGGCCACAGTGTCTAACTG	166	<i>H. sapiens</i>	542
187388	3	10159	AATCAAGTGTCACTCAGACTG	167	<i>H. sapiens</i>	543
187390	3	10349	GGGTAGTCATAACAGTACTG	169	<i>H. sapiens</i>	544
187391	3	10699	AGAGCACACGGTCTTCAGTG	170	<i>H. sapiens</i>	545
187393	3	10839	TTACAGCTAGAGGGCCTCTT	172	<i>H. sapiens</i>	546
187398	3	12149	CACCGTGGGCATGGATATGG	176	<i>H. sapiens</i>	547
187399	3	12265	GGGAATCTGATGAGGAAACT	177	<i>H. sapiens</i>	548
187400	3	12380	TGTCAACAAGTACCACTGGG	178	<i>H. sapiens</i>	549
187403	3	12749	ACCTGGGATATACTAGGG	181	<i>H. sapiens</i>	550
187406	3	13299	CCAAGTATAGTTGGCTGGAC	183	<i>H. sapiens</i>	551
187407	3	13779	TACATGAAGCTTGCTCCAGG	184	<i>H. sapiens</i>	552
197724	3	229	ATGTCAGCCTGGTCTGTCCA	185	<i>H. sapiens</i>	553
197725	3	269	GCACCTCCGGAAGTACACAT	186	<i>H. sapiens</i>	554
197726	3	389	CTGCAGCTTCATCCTGAAGA	187	<i>H. sapiens</i>	555
197727	3	449	TGAGGGCAAAGCCTTGCTGA	188	<i>H. sapiens</i>	556
197728	3	529	CCATTCAGAAAGGGAAGCAG	189	<i>H. sapiens</i>	557
197729	3	709	CGAGGAAGGGCAATGTGGCA	190	<i>H. sapiens</i>	558
197730	3	829	CCTTGTCAACTCTGATCAGC	191	<i>H. sapiens</i>	559
197731	3	849	AGCAGCCAGTCTGTCAAGTA	192	<i>H. sapiens</i>	560
197732	3	889	AGCATGTGGCAGAAAGCCATC	193	<i>H. sapiens</i>	561
197733	3	1059	GAGAGCACCAAATCCACATC	194	<i>H. sapiens</i>	562
197734	3	1199	CCTCAGTGATGAAGCAGTCA	195	<i>H. sapiens</i>	563
197735	3	1349	GATAGATGTGGTCACCTACC	196	<i>H. sapiens</i>	564
197736	3	1390	CCTCAGCACAGCAGCTGCCA	197	<i>H. sapiens</i>	565
197737	3	1589	GATTCTGCGGGTCATTGGAA	198	<i>H. sapiens</i>	566
197738	3	1678	CAAAGCCATCACTGATGATC	199	<i>H. sapiens</i>	567
197739	3	1699	AGAAAGCTGCCATCCAGGCT	200	<i>H. sapiens</i>	568
197740	3	1749	CAGGAGGTTCTTCTTCAGAC	201	<i>H. sapiens</i>	569
197741	3	1829	GAGTCCTTACAGGCAGATA	202	<i>H. sapiens</i>	570
197742	3	1919	TGCCAATATCTTGAAGTCAAG	203	<i>H. sapiens</i>	571
197743	3	2189	CATCGAGATTGGCTTGGAAAG	204	<i>H. sapiens</i>	572
197744	3	2649	GGAGCTGGATTACAGTTGCA	205	<i>H. sapiens</i>	573

ES 2 417 879 T3

ID DE SITIO	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO
197745	3	2729	CAACATGCAGGCTGAACTGG	206	<i>H. sapiens</i>	574
197746	3	2949	ACATTACATTTGGTCTCTAC	207	<i>H. sapiens</i>	575
197747	3	3059	CTCAGGCGCTTACTCCAACG	208	<i>H. sapiens</i>	576
197748	3	3118	GGGACACCAGATTAGAGCTG	209	<i>H. sapiens</i>	577
197749	3	3189	GAGCTCCAGAGAGAGGACAG	210	<i>H. sapiens</i>	578
197750	3	3289	ATCGGCAGAGTATGACCTTG	211	<i>H. sapiens</i>	579
197751	3	3488	CAAGGGTGTTATTTCCATAC	212	<i>H. sapiens</i>	580
197752	3	3579	GACTCATCTGCTACAGCTTA	213	<i>H. sapiens</i>	581
197753	3	4039	GCAAATCCTCCAGAGATCTA	214	<i>H. sapiens</i>	582
197754	3	4180	CTCTCCTGGGTGTTCTAGAC	215	<i>H. sapiens</i>	583
197755	3	4299	ATGAAGGCTGACTCTGTGGT	216	<i>H. sapiens</i>	584
197756	3	4511	GGGACCACAGATGTCTGCTT	217	<i>H. sapiens</i>	585
197757	3	4660	CTGGCCGGCTCAATGGAGAG	218	<i>H. sapiens</i>	586
197758	3	4919	GCTGCGTTCTGAATATCAGG	219	<i>H. sapiens</i>	587
197759	3	5009	TGCTGACATCTTAGGCACTG	220	<i>H. sapiens</i>	588
197760	3	5109	AAGTGTAGTCTCCTGGTGCT	221	<i>H. sapiens</i>	589
197761	3	5212	CAAAATTCAGTCTGGATGGG	222	<i>H. sapiens</i>	590
197762	3	5562	GGGAAACTACGGCTAGAACC	223	<i>H. sapiens</i>	591
197763	3	5589	CTGCATGTGGCTGGTAACCT	224	<i>H. sapiens</i>	592
197764	3	5839	CCATGACCATCGATGCACAT	225	<i>H. sapiens</i>	593
197765	3	5869	ATGGGAAACTCGCTCTCTGG	226	<i>H. sapiens</i>	594
197766	3	5979	AGTCATCATCTCGTGTCTAG	227	<i>H. sapiens</i>	595
197767	3	6099	GAATACAGCCAGGACTTGGA	228	<i>H. sapiens</i>	596
197768	3	6144	GGCGTGGAGCTTACTGGACG	229	<i>H. sapiens</i>	597
197769	3	6249	GAGATGAGAGATGCCGTTGA	230	<i>H. sapiens</i>	598
197770	3	6759	AGTCTTGATGAGCACTATCA	231	<i>H. sapiens</i>	599
197771	3	6889	CTAAGTACCAAATCAGAATC	232	<i>H. sapiens</i>	600
197772	3	7149	GTCCATGAGTTAATCGAGAG	233	<i>H. sapiens</i>	601
197773	3	7549	AGGCCACAGTTGCAGTGTAT	234	<i>H. sapiens</i>	602
197774	3	7779	TCTGATTGGTGGACTCTTGC	235	<i>H. sapiens</i>	603
197775	3	7929	GAAGTCAGTCTTCAGGCTCT	236	<i>H. sapiens</i>	604
197776	3	8929	CCAGATTCTCAGATGAGGGA	237	<i>H. sapiens</i>	605
197778	3	10240	CATCTGTCAATTGATGCACTG	238	<i>H. sapiens</i>	606
197779	3	10619	AGGAGATGTCAAGGGTTCGG	239	<i>H. sapiens</i>	607
197780	3	10659	GGAECTATTGCTAGTGAGGC	240	<i>H. sapiens</i>	608
197781	3	10899	CTCTCTCCATGGCAAATGTC	241	<i>H. sapiens</i>	609
197783	3	11979	CACCGTGACTTCAGTGCAGA	243	<i>H. sapiens</i>	610
197784	3	12249	ACTGAGTTGAGGGTCCGGGA	244	<i>H. sapiens</i>	611
197786	3	13958	CACATATGAACTGGACCTGC	245	<i>H. sapiens</i>	612
197787	3	14008	TCTGAACTCAGAAGGATGGC	246	<i>H. sapiens</i>	613
216825	3	3249	GGTGCGAAGCAGACTGAGGC	247	<i>H. sapiens</i>	614
216826	3	3	TCCCACCGGGACCTGCGGGG	248	<i>H. sapiens</i>	615
216827	3	6	CACCGGGACCTGCGGGGCTG	249	<i>H. sapiens</i>	616
216828	3	23	CTGAGTGCCCTTCTCGGTTG	250	<i>H. sapiens</i>	617
216829	3	35	CTCGGTTGCTGCCGCTGAGG	251	<i>H. sapiens</i>	618
216830	3	36	TCGGTTGCTGCCGCTGAGGA	252	<i>H. sapiens</i>	619
216831	3	37	CGGTTGCTGCCGCTGAGGAG	253	<i>H. sapiens</i>	620
216832	3	39	GTTGCTGCCGCTGAGGAGCC	254	<i>H. sapiens</i>	621
216833	3	43	CTGCCGCTGAGGAGCCCGCC	255	<i>H. sapiens</i>	622
216834	3	116	ACCGCAGCTGGCGATGGACC	256	<i>H. sapiens</i>	623
216835	3	120	CAGCTGGCGATGGACCCGCC	257	<i>H. sapiens</i>	624
216836	3	13800	GAACTTACTATCATCCTCTA	258	<i>H. sapiens</i>	625
216838	3	13854	TCCAATTGAACTTTCACATA	260	<i>H. sapiens</i>	626

ES 2 417 879 T3

ID DE SITIO	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO
216839	3	13882	AAAATTCAAACCTGCCTATAT	261	<i>H. sapiens</i>	627
216840	3	13903	GATAAAACCATACAGTGAGC	262	<i>H. sapiens</i>	628
216841	3	13904	ATAAAACCATACAGTGAGCC	263	<i>H. sapiens</i>	629
216842	3	13908	AACCATACAGTGAGCCAGCC	264	<i>H. sapiens</i>	630
216843	3	13909	ACCATACAGTGAGCCAGCCT	265	<i>H. sapiens</i>	631
216844	3	13910	CCATACAGTGAGCCAGCCTT	266	<i>H. sapiens</i>	632
216845	3	13917	GTGAGCCAGCCTTGCAGTAG	267	<i>H. sapiens</i>	633
216846	3	13922	CCAGCCTTGCAGTAGGCAGT	268	<i>H. sapiens</i>	634
216847	3	13934	TAGGCAGTAGACTATAAGCA	269	<i>H. sapiens</i>	635
216848	3	13937	GCAGTAGACTATAAGCAGAA	270	<i>H. sapiens</i>	636
216849	3	13964	TGAACTGGACCTGCACCAAA	271	<i>H. sapiens</i>	637
216850	3	13968	CTGGACCTGCACCAAAGCTG	272	<i>H. sapiens</i>	638
216851	3	13970	GGACCTGCACCAAAGCTGGC	273	<i>H. sapiens</i>	639
216852	3	13974	CTGCACCAAAGCTGGCACCA	274	<i>H. sapiens</i>	640
216853	3	13978	ACCAAAGCTGGCACCAAGGC	275	<i>H. sapiens</i>	641
216854	3	13997	CTCGGAAGGTCTCTGAACTC	276	<i>H. sapiens</i>	642
216855	3	14012	AACTCAGAAGGATGGCATT	277	<i>H. sapiens</i>	643
216856	3	14014	CTCAGAAGGATGGCATT	278	<i>H. sapiens</i>	644
216857	3	14049	ATCAGGATCTGAGTTAT	279	<i>H. sapiens</i>	645
216858	3	14052	AGGATCTGAGTTATTTGCT	280	<i>H. sapiens</i>	646
216859	3	14057	CTGAGTTATTTGCTAACT	281	<i>H. sapiens</i>	647
216860	3	14064	ATTTTGCTAACTTGGGGGA	282	<i>H. sapiens</i>	648
216861	3	14071	TAACTTGGGGGAGGAGGAA	283	<i>H. sapiens</i>	649
217030	3	14087	GGAACAAATAAATGGAGTCT	284	<i>H. sapiens</i>	650
224316	3	3230	GTTTGTAACCTCAAGCAGAAG	285	<i>H. sapiens</i>	651
224317	3	3232	TTGTAACCTCAAGCAGAAGGT	286	<i>H. sapiens</i>	652
224318	3	3234	GTAACCTCAAGCAGAAGGTGC	287	<i>H. sapiens</i>	653
224319	3	3236	AACTCAAGCAGAAGGTGCGA	288	<i>H. sapiens</i>	654
224320	3	3238	CTCAAGCAGAAGGTGCGAAG	289	<i>H. sapiens</i>	655
224321	3	3240	CAAGCAGAAGGTGCGAAGCA	290	<i>H. sapiens</i>	656
224322	3	3242	AGCAGAAGGTGCGAAGCAGA	291	<i>H. sapiens</i>	657
224323	3	3244	CAGAAGGTGCGAAGCAGACT	292	<i>H. sapiens</i>	658
224324	3	3246	GAAGGTGCGAAGCAGACTGA	293	<i>H. sapiens</i>	659
224325	3	3248	AGGTGCGAAGCAGACTGAGG	294	<i>H. sapiens</i>	660
224326	3	3250	GTGCGAAGCAGACTGAGGCT	295	<i>H. sapiens</i>	661
224327	3	3252	GCGAAGCAGACTGAGGCTAC	296	<i>H. sapiens</i>	662
224328	3	3254	GAAGCAGACTGAGGCTACCA	297	<i>H. sapiens</i>	663
224329	3	3256	AGCAGACTGAGGCTACCATG	298	<i>H. sapiens</i>	664
224330	3	3258	CAGACTGAGGCTACCATGAC	299	<i>H. sapiens</i>	665
224331	3	3260	GACTGAGGCTACCATGACAT	300	<i>H. sapiens</i>	666
224332	3	3262	CTGAGGCTACCATGACATTC	301	<i>H. sapiens</i>	667
224333	3	3264	GAGGCTACCATGACATTCAA	302	<i>H. sapiens</i>	668
224334	3	3266	GGCTACCATGACATTCAAAT	303	<i>H. sapiens</i>	669
224335	3	3268	CTACCATGACATTCAAATAT	304	<i>H. sapiens</i>	670
224336	3	5582	CCTGAAGCTGCATGTGGCTG	305	<i>H. sapiens</i>	671
224337	3	5584	TGAAGCTGCATGTGGCTGGT	306	<i>H. sapiens</i>	672
224338	3	5586	AAGCTGCATGTGGCTGGTAA	307	<i>H. sapiens</i>	673
224339	3	5588	GCTGCATGTGGCTGGTAACC	308	<i>H. sapiens</i>	674
224340	3	5590	TGCATGTGGCTGGTAACCTA	309	<i>H. sapiens</i>	675
224341	3	5592	CATGTGGCTGGTAACCTAAA	310	<i>H. sapiens</i>	676
224342	3	5594	TGTGGCTGGTAACCTAAAAG	311	<i>H. sapiens</i>	677
224343	3	5596	TGGCTGGTAACCTAAAAGGA	312	<i>H. sapiens</i>	678
224344	3	5598	GCTGGTAACCTAAAAGGAGC	313	<i>H. sapiens</i>	679

ES 2 417 879 T3

ID DE SITIO	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO
224345	3	5600	TGGTAACCTAAAAGGAGCCT	314	<i>H. sapiens</i>	680
224346	3	5602	GTAACCTAAAAGGAGCCTAC	315	<i>H. sapiens</i>	681
224347	3	5604	AACCTAAAAGGAGCCTACCA	316	<i>H. sapiens</i>	682
224348	3	5606	CCTAAAAGGAGCCTACCAA	317	<i>H. sapiens</i>	683
187366	318	3121	GGCGCGAAGCAGACTGAGGC	319	<i>H. sapiens</i>	684
187404	318	12651	CACTATGTTTCATGAGGGAGG	323	<i>H. sapiens</i>	685
197777	318	9851	CCATCATAGGTTCTGACGTC	324	<i>H. sapiens</i>	686
197785	318	12561	GAAGCTGATTGACTCACTCA	325	<i>H. sapiens</i>	687
224349	318	3104	TTGTAACCTCAAGCAGAAGGC	326	<i>H. sapiens</i>	688
224350	318	3106	GTAACCTCAAGCAGAAGGCGC	327	<i>H. sapiens</i>	689
224351	318	3108	AACTCAAGCAGAAGGCGCGA	328	<i>H. sapiens</i>	690
224352	318	3110	CTCAAGCAGAAGGCGCGAAG	329	<i>H. sapiens</i>	691
224353	318	3116	CAGAAGGCGCGAAGCAGACT	330	<i>H. sapiens</i>	692
224354	318	3118	GAAGGCGCGAAGCAGACTGA	331	<i>H. sapiens</i>	693
224355	318	3120	AGGCGCGAAGCAGACTGAGG	332	<i>H. sapiens</i>	694
224356	318	3122	GCGCGAAGCAGACTGAGGCT	333	<i>H. sapiens</i>	695
224328	3	3254	GAAGCAGACTGAGGCTACCA	514	<i>H. sapiens</i>	696
224353	318	3116	CAGAAGGCGCGAAGCAGACT	515	<i>H. sapiens</i>	697
216862	334	904	TCTTTCTCCTGTCTTACAGA	335	<i>H. sapiens</i>	698
216866	334	1988	CCCACGTTAGAAGATGCGAC	339	<i>H. sapiens</i>	699
216868	334	2722	AATATGGTAGACATGAGCCA	341	<i>H. sapiens</i>	700
216869	334	2791	CATTAGCTGCATTTCAACTG	342	<i>H. sapiens</i>	701
216870	334	3045	ACTTTCACTCCTAGTCTGCA	343	<i>H. sapiens</i>	702
216874	334	3527	CCATGTCCAGGTAAGTCATG	347	<i>H. sapiens</i>	703
216876	334	3603	GCACCAGGCACGGATGTGAC	349	<i>H. sapiens</i>	704
216877	334	3864	GTGGGGTCCCAGAGGCACTG	350	<i>H. sapiens</i>	705
216878	334	3990	GCTGATCGGCCACTGCAGCT	351	<i>H. sapiens</i>	706
216879	334	4251	TCCACGTGGCTGGGGAGGTC	352	<i>H. sapiens</i>	707
216880	334	4853	TGTAATGTATGGTGATCAGA	353	<i>H. sapiens</i>	708
216881	334	5023	GAGAGTACCCAGTGGGAAAT	354	<i>H. sapiens</i>	709
216882	334	5055	AGTCAGCATGGGCTTCAGCC	355	<i>H. sapiens</i>	710
216883	334	5091	CAAAGAATGACTGTCCAAC	356	<i>H. sapiens</i>	711
216884	334	5096	GAATGACTGTCCAACAAGTG	357	<i>H. sapiens</i>	712
216885	334	5301	TATCTACTGTAATTTAAAT	358	<i>H. sapiens</i>	713
216886	334	5780	CTGATATGGGTGGAGAACAG	359	<i>H. sapiens</i>	714
216887	334	6353	TCTGGGACAGGTATGAGCTC	360	<i>H. sapiens</i>	715
216888	334	6534	TGATAGCAGTGGCCCTTGAA	361	<i>H. sapiens</i>	716
216889	334	6641	GGATTGGCGTAAAATACTGG	362	<i>H. sapiens</i>	717
216890	334	6661	TGCCCGAGGTTCTCCTGCC	363	<i>H. sapiens</i>	718
216894	334	7059	GCACTAGCAAGACCACACTC	367	<i>H. sapiens</i>	719
216895	334	7066	CAAGACCACACTCTGCATAG	368	<i>H. sapiens</i>	720
216897	334	7209	TCCTCCATAGGATACCGTGT	370	<i>H. sapiens</i>	721
216899	334	7702	GGATGTAGGGCAGCAAAACC	372	<i>H. sapiens</i>	722
216900	334	7736	TCTGCACAAGGACTCCTTGT	373	<i>H. sapiens</i>	723
216901	334	8006	CAGCCTGTCTCAGTGAACAT	374	<i>H. sapiens</i>	724
216903	334	8239	CAGGATGCTTCCAGTCTAAT	376	<i>H. sapiens</i>	725
216904	334	8738	AAATGCTCGTCTCCAATCTC	377	<i>H. sapiens</i>	726
216906	334	9208	AACTTGTGTATCCAAATCCA	379	<i>H. sapiens</i>	727
216908	334	9545	TGACATGGTGTGCTTCCCTG	381	<i>H. sapiens</i>	728
216910	334	9770	ACACTGGTGTCTGGCTACC	383	<i>H. sapiens</i>	729
216911	334	9776	GTGTTCTGGCTACCTCTAGT	384	<i>H. sapiens</i>	730
216913	334	10341	TCCTGGCATAGGTCACAGTA	386	<i>H. sapiens</i>	731
216914	334	10467	ATGTCAACAGTAGCACCTCC	387	<i>H. sapiens</i>	732

ES 2 417 879 T3

ID DE SITIO	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO
216915	334	10522	TAGACTCAGACAAGTCTGGA	388	<i>H. sapiens</i>	733
216917	334	10587	CCTAAGTTGCTCATCTCTGG	390	<i>H. sapiens</i>	734
216922	334	11337	TGCGCTGAGTTCATGAAAC	395	<i>H. sapiens</i>	735
216923	334	11457	CTATTGCAGGTGCTCTCCAG	396	<i>H. sapiens</i>	736
216926	334	12155	CAGAGGAACATCTTGACCT	399	<i>H. sapiens</i>	737
216928	334	12221	CTCTGCTCCTTACTCTTG TG	401	<i>H. sapiens</i>	738
216929	334	12987	GTAATTTCTCACCATCCATC	402	<i>H. sapiens</i>	739
216930	334	13025	TTCTGAGTCTCAATTGTCTA	403	<i>H. sapiens</i>	740
216931	334	13057	CTATGTCCTTGTGTGCACAT	404	<i>H. sapiens</i>	741
216932	334	13634	GCCTATTGCCATTTGTATGT	405	<i>H. sapiens</i>	742
216933	334	13673	CTATTCATGTCCTTTGCCTA	406	<i>H. sapiens</i>	743
216935	334	14567	GATTCTGCGGGTAATCTCAG	408	<i>H. sapiens</i>	744
216937	334	14680	TCAATGCAGGTCATTGGAAA	410	<i>H. sapiens</i>	745
216938	334	15444	CTACCAGATTGACCATCCCT	411	<i>H. sapiens</i>	746
216940	334	15757	TACTTGATAGTGCTCTAGGA	413	<i>H. sapiens</i>	747
216941	334	15926	TTGACTGCAGGACCAGGAGG	414	<i>H. sapiens</i>	748
216942	334	16245	AACAAACACTTGTGCAAATG	415	<i>H. sapiens</i>	749
216950	334	18519	AATGAGACCAAACCTCCACT	423	<i>H. sapiens</i>	750
216951	334	18532	TTCCACTTTGAAGCTAGCAA	424	<i>H. sapiens</i>	751
216952	334	18586	GATCTGGAGCTTATTCTTGA	425	<i>H. sapiens</i>	752
216953	334	18697	ACCTCATGTGACTTGTATGC	426	<i>H. sapiens</i>	753
216954	334	18969	TTCTTAAGAAACACCTTGTA	427	<i>H. sapiens</i>	754
216955	334	19250	TAGGCCCATCCTGGCTGCAT	428	<i>H. sapiens</i>	755
216956	334	19340	AAACTCTCAGGATATGGTAA	429	<i>H. sapiens</i>	756
216957	334	19802	ATACCTTCCTCTACCTTTGC	430	<i>H. sapiens</i>	757
216958	334	19813	TACCTTTGCTGAAGGTCCTT	431	<i>H. sapiens</i>	758
216961	334	20567	ATCTATCTAGTGAAATTTCT	434	<i>H. sapiens</i>	759
216962	334	20647	TCAGCTCATCAAATATGCT	435	<i>H. sapiens</i>	760
216963	334	20660	ATATGCTAGTCCTTCCCTTC	436	<i>H. sapiens</i>	761
216965	334	21316	CAAAGGTCTGAGTTATCCAG	438	<i>H. sapiens</i>	762
216967	334	21422	TGACTTATAGATGCAGGCTG	440	<i>H. sapiens</i>	763
216968	334	21634	TCAGTGGAGGGTAATCTTT	441	<i>H. sapiens</i>	764
216969	334	21664	TGCCTAGCCAGTTTGAAAGA	442	<i>H. sapiens</i>	765
216970	334	21700	CCTGCAGAATTTTGCCAGGC	443	<i>H. sapiens</i>	766
216972	334	22048	GTAGCTAGGTAGGTAAAGCA	445	<i>H. sapiens</i>	767
216973	334	22551	TTGAGTGAGACACACAAGGT	446	<i>H. sapiens</i>	768
216974	334	22694	GTGCTAGTCAGGGAATGCAT	447	<i>H. sapiens</i>	769
216976	334	22903	GGGAGAGAGCATGCCAGC	449	<i>H. sapiens</i>	770
216977	334	22912	GCATGCCAGCTGCGAAAGC	450	<i>H. sapiens</i>	771
216978	334	23137	AGCCAGGTATAGAAAGGAGT	451	<i>H. sapiens</i>	772
216979	334	23170	AACTTTCTAAGAGGCAGAAAT	452	<i>H. sapiens</i>	773
216981	334	23882	TCTTAGTCTGGTCATGAGTG	454	<i>H. sapiens</i>	774
216983	334	24184	AGTAGGAGATTTTCATATGAA	456	<i>H. sapiens</i>	775
216985	334	24559	TCTTACCAGCAACACATTA	458	<i>H. sapiens</i>	776
216987	334	24800	ATGGCCACCTAGCATGGCAC	460	<i>H. sapiens</i>	777
216989	334	24991	CATGTTTCTGAGCCTCCAGA	462	<i>H. sapiens</i>	778
216990	334	25067	TAGGTGGCTCCCTGTCTTCA	463	<i>H. sapiens</i>	779
216991	334	25152	TCCAAAGTCTTGGGAATCCT	464	<i>H. sapiens</i>	780
216995	334	26749	ACAAAGAAAGGGGGAGTTGG	468	<i>H. sapiens</i>	781
216996	334	26841	TCGTGTCTTCTGGCCCAGA	469	<i>H. sapiens</i>	782
216997	334	27210	GCAGTGCCAGCACACAATA	470	<i>H. sapiens</i>	783
216998	334	27815	ACTCGTCCAGGTGCGAAGCA	471	<i>H. sapiens</i>	784
216999	334	28026	GCCACCTAAGGTAAGAAGG	472	<i>H. sapiens</i>	785

ID DE SITIO	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	COMP. INV DE SEQ ID NO	ACTIVO EN	SEQ ID NO
217000	334	28145	ATCAGAGTGGCAGAGAGAGC	473	<i>H. sapiens</i>	786
217002	334	28919	TTTACCATAGTTGTGACACA	475	<i>H. sapiens</i>	787
217006	334	29871	CATTTTGTAGGCAATG4GCT	479	<i>H. sapiens</i>	788
217007	334	30181	GCATTAGTAAACATGAGAAC	480	<i>H. sapiens</i>	789
217009	334	30931	TTCATTTTCAGCGATGGCCGG	482	<i>H. sapiens</i>	790
217013	334	39562	GAAAATCTAGTGTCAATTCAA	486	<i>H. sapiens</i>	791
217016	334	39789	TCCTATACAGTTTTGGGAAC	489	<i>H. sapiens</i>	792
217017	334	39904	AAGGACTTCAGTATGGAGCT	490	<i>H. sapiens</i>	793
217018	334	39916	ATGGAGCTTTTATTGAATTG	491	<i>H. sapiens</i>	794
217022	334	40412	CCATCAGCACTATTATTTAT	495	<i>H. sapiens</i>	795
217023	334	40483	ATAGGCAAGCTCAGCCATAG1	496	<i>H. sapiens</i>	796
217025	334	40576	TGCTAGATGAGATACATCAA	498	<i>H. sapiens</i>	797
217026	334	40658	GAAGACCAAACATGGTTCTA	499	<i>H. sapiens</i>	798
217029	334	41130	CTCTGTTTAGTCCTCTCCAG	502	<i>H. sapiens</i>	799
1217032	503	490	CATTGATAAAATGTTCTGGC	505	<i>H. sapiens</i>	800
217033	503	504	TCTGGCACAGCAAAACCTCT	506	<i>H. sapiens</i>	801
217034	503	506	TGGCACAGCAAAACCTCTAG	507	<i>H. sapiens</i>	802
217037	503	523	TAGAACACATAGTGTGATTT	510	<i>H. sapiens</i>	803
217039	503	526	AACACATAGTGTGATTTAAG	512	<i>H. sapiens</i>	804

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

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

Ejemplo 37

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

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

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

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

Tabla 19

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

n° de ISIS	Dosis				SEQ ID NO
	37 nM	75 nM	150 nM	300 nM	
	% inhibición				
271009	82	91	94	96	319
281625	62	76	84	94	224
301014	75	90	96	98	249
301027	80	90	95	96	262
301028	70	79	85	92	263
301029	54	67	79	85	264
301030	64	75	87	92	265
301031	61	82	92	96	266
301034	73	87	93	97	269
301036	67	83	92	95	271
301037	73	85	89	96	272
301045	77	86	94	98	280

## 5 Ejemplo 38

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

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

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

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

## 20 Tabla 20

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

n° de ISIS	Dosis					SEQ ID No
	12,5 nM	37 nM	75 nM	150 nM	300 nM	
	% inhibición					
271009	67	86	92	94	95	319
281625	44	66	83	85	94	224
301012	63	79	90	92	95	247
308638	42	73	91	96	97	247
308642	59	84	91	97	98	319
308651	57	76	84	90	88	319
308658	29	61	73	78	90	224



## Ejemplo 39

## Síntesis de ARN

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

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

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

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

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

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

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

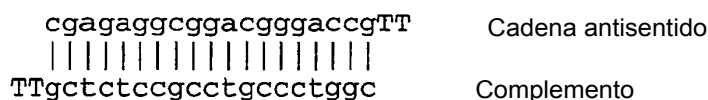
## Ejemplo 40

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

Se diseñan una serie de dúplex de ácido nucleico que comprenden los compuestos antisentido de la presente invención y sus complementarios para dirigirlos a la apolipoproteína B. La secuencia de bases nucleicas de la cadena antisentido del dúplex comprende al menos una parte de un oligonucleótido descrito en la presente memoria.

Los extremos de las cadenas se pueden modificar por la adición de una o más bases nucleicas naturales o modificadas para formar un extremo saliente. Después se diseña la cadena del mismo sentido del ARN de doble cadena y se sintetiza como el complemento de la cadena antisentido y también puede contener modificaciones o adiciones en los extremos. Por ejemplo, en una realización, ambas cadenas del dúplex del ARNdc serían complementarias alrededor de las bases nucleicas centrales, cada una con extremos salientes en uno o ambos extremos. Las cadenas antisentido y del mismo sentido del dúplex comprenden de aproximadamente 17 a 25 nucleótidos, o de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos. Alternativamente, las cadenas antisentido y del mismo sentido comprenden 20, 21 ó 22 nucleótidos.

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



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



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

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

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

Ejemplo 41

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

Ensayos fenotípicos

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

En un ejemplo no limitante, las células que se determina que son adecuadas para un ensayo fenotípico particular (es

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

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

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

#### Estudios In Vivo

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

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

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

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

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

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

#### Ejemplo 42

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

45 Se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigir a diferentes regiones del ARN de la apolipoproteína B de conejo, usando las secuencias publicadas (número de acceso en GenBank X07480.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 808, número de acceso en GenBank M17780.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 809, y se obtuvo una secuencia usando los cebadores descritos previamente (Tanaka, *Journ. Biol. Chem.*, 1993, 268, 12713-12718) que representan el ARNm de la apolipoproteína B de conejo, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 810). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 21. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el oligonucleótido. Todos los compuestos en la tabla 21 son oligonucleótidos quiméricos ("gámpmeros") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 10 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de 5 nucleótidos. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE) nucleótidos.

55 Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas. Se analizó el efecto de los compuestos en los

## ES 2 417 879 T3

niveles de ARNm de la apolipoproteína B de conejo en hepatocitos primarios de conejo por PCR en tiempo real cuantitativa, como se describe en otros ejemplos en la presente memoria. Los hepatocitos primarios de conejo se trataron con los compuestos 150 mM de la tabla 21. Para la apolipoproteína B de conejo los cebadores de la PCR eran:

- 5 cebador directo: AAGCACCCCAATGTCACC (SEQ ID NO: 811) cebador inverso: GGGATGGCAGAGCCAATGTA (SEQ ID NO: 812) y la sonda para PCR era: FAM- TCCTGGATTCAAGCTTCTATGTGCCTTCA - TAMRA (SEQ ID NO: 813) donde FAM (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante indicador fluorescente y TAMRA (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) es el colorante atenuador. Los datos son medias de dos experimentos. Si está presente, "N.D." indica "no hay datos".

10 Tabla 21

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

nº de ISIS	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	SECUENCIA	% de INHIB.	SEQ ID NO
233149	808	1	TGCTTGGAGAAGGTAAGATC	0	814
233150	810	1	GCGTTGTCTCCGATGTTCTG	20	815
233151	809	13	TAATCATTAACTTGCTGTGG	20	816
233152	808	22	TCAGCACGTAGCAATGCATT	0	817
233153	808	31	GCCTGATACTCAGCACGTAG	0	818
233154	809	31	CAATTGAATGTAAGTACAGATA	18	819
233155	808	51	ACCTCAGTGAAGTTGTAATCA	47	820
233156	809	51	CACTGGAAACTTGTCTCTCC	23	821
233157	809	71	AGTAGTTAGTTTCTCCTTGG	0	822
233159	808	121	TCAGTGCCCAAGATGTCAGC	0	823
233160	810	121	ATTGGAATAATGTATCCAGG	81	824
233161	809	130	TTGGCATTATCCAATGCAGT	28	825
233162	808	151	GTTGCCTTGTGAGCAGCAGT	0	826
233163	810	151	ATTGTGAGTGGAGATACTTC	80	827
233164	809	171	CATATGTCTGAAGTTGAGAC	8	828
233165	808	181	GTAGATACTCCATTTTGGCC	0	829
233166	810	181	GGATCACATGACTGAATGCT	82	830
233167	808	201	TCAAGCTGGTTGTTGCACTG	28	831
233168	808	211	GGACTGTACCTCAAGCTGGT	0	832
233169	808	231	GCTCATTCTCCAGCATCAGG	14	833
233170	809	251	TTGATCTATAATACTAGCTA	23	834
233172	810	282	ATGGAAGACTGGCAGCTCTA	86	835
233173	808	301	TTGTGTTTCTTGAAGCGGCC	3	836
233174	809	301	TGTGCACGGATATGATAACG	21	837
233175	810	306	GACCTTGAGTAGATTCCTGG	90	838
233176	810	321	GAAATCTGGAAGAGAGACCT	62	839
233177	808	331	GTAGCTTTCCCATCTAGGCT	0	840
233178	808	346	GATAACTCTGTGAGGGTAGC	0	841
233179	810	371	ATGTTGCCCATGGCTGGAAT	65	842
233180	809	381	AAGATGCAGTACTACTTCCA	13	843
233181	808	382	GCACCCAGAATCATGGCCTG	0	844
233182	809	411	CTTGATACTTGGTATCCACA	59	845
233183	810	411	CAGTGTAAATGATCGTTGATT	88	846
233184	810	431	TAAAGTCCAGCATTGGTATT	69	847
233185	810	451	CAACAATGTCTGATTGGTTA	73	848
233186	810	473	GAAGAGGAAGAAAGGATATG	60	849
233187	810	481	TGACAGATGAAGAGGAAGAA	66	850
233188	810	500	TTGTACTGTAGTGCATCAAT	74	851
233189	809	511	GCCTCAATCTGTTGTTTCAG	46	852
233190	810	520	ACTTGAGCGTGCCCTCTAAT	69	853
233191	809	561	GAAATGGAATTGTAGTTCTC	31	854

Ejemplo 43

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

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

10 Tabla 22

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

n° de ISIS	Porcentaje de inhibición			
	300 nM	150 nM	50 nM	10 nM
233160	80	74	67	33
233166	73	79	81	66
233172	84	81	76	60
233175	93	90	85	67
233183	80	81	71	30

Ejemplo 44

15 Efectos de la inhibición antisentido de la apolipoproteína B en ratones LDLr/- - Dosis-Respuesta

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

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

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

Tabla 23

Efectos del tratamiento con ISIS 147764 en ratones LDLr<sup>-/-</sup> macho y hembra en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B, enzimas hepáticas, colesterol y triglicéridos

Nº de ISIS	Dosis mg/kg	Enzimas hepáticas IU/l		Lipoproteínas mg/dl				% de ARNm control
		AST	ALT	COL.	HDL	LDL	TRIG.	
Machos								
Disolución Salina		68,4	26,6	279,2	125,4	134,7	170,6	100,0
147764	10	57,6	29,8	314,2	150,0	134,7	198,6	61,7
	25	112,6	78,8	185,0	110,6	66,2	104,2	30,7
	50	163,6	156,8	165,6	107,8	51,2	113,4	16,6
270906	50	167,4	348,0	941,0	244,2	541,9	844,8	N.D.
Atorvastatina	20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	110,9
Hembras								
Disolución Salina		65,0	23,4	265,8	105,8	154,9	121,4	100,0
147764	1,0	82,0	27,2	269,6	121,0	127,8	140,8	64,2
	25	61,4	32,2	175,8	99,5	68,9	100,4	41,3
	50	134,6	120,4	138,2	92,2	45,9	98,0	18,5
270906	50	96,0	88,6	564,6	200,0	310,0	240,4	N.D.
Atorvastatina	20	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	109,0

#### 5 Ejemplo 45

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

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

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

#### Ejemplo 46

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

Se amplificó una parte del ARNm de la apolipoproteína B de macaco cangrejero que no está disponible en la técnica. Las posiciones de 2920 a 3420 de la secuencia de ARNm de la apolipoproteína B humana (número de acceso en GenBank NM\_000384.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 3) contienen el segmento diana preferido con el cual hibrida ISIS 301012 y se amplificó y secuenció el correspondiente segmento del ARNm de la apolipoproteína B del macaco cangrejero. El sitio con el que hibrida ISIS 301012 en la apolipoproteína B humana se amplificó poniendo los cebadores 5' en la posición 2920 y 3' en la posición 3420. Se adquirieron hepatocitos de macaco cangrejero en In Vitro Technologies (Gaithersburg, MD). Se produjeron fragmentos de 500 pb usando ADNc de hepatocitos 1º humanos y de macaco cangrejero y se produjeron por transcripción inversa del ARN total seguido de 40 ciclos de amplificación por PCR. Después de la purificación en gel de los amplicones humano y de macaco cangrejero, se realizaron las reacciones de secuenciación directa e inversa de cada producto mediante Retrogen (se usó el kit de Invitrogen para crear el ADN, monocatenario y proporcionar los reactivos para la reacción de PCR con Amplitaq). La secuencia del macaco cangrejero se incorpora en la presente memoria como SEQ ID NO: 855 y es idéntica en el 96% a las posiciones de 2920 a 3420 del ARNm de la apolipoproteína B humana.

Ejemplo 47

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

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

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

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

Tabla 24

Efectos del tratamiento con ISIS 281625 y 301012 en ratones en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B, enzimas hepáticas, colesterol y triglicéridos.

	Nº de ISIS		
	Disolución salina	281625	301012
Enzimas hepáticas IU/l			
AST	70,3	265,8	208,4
ALT	32,8	363,8	137,4
Lipoproteínas mg/dl			
COL.	109,5	152,0	145,1
HDL	67,3	84,6	98,6
LDL	30,2	49,8	36,6
TRIG.	194,5	171,1	157,8
% de ARNm control			
ARNm humano	100,0	45,2	23,7
ARNm de ratón	100,0	111,0	94,6

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

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

40 También se recogieron muestras de suero a las 2, 4, 6 y 8 semanas y se evaluó la expresión de la apolipoproteína B usando un kit de ELISA específico para la apolipoproteína B humana (ALerCHEK Inc., Portland, ME). La cuantificación de la proteína apolipoproteína B humana en el suero por ELISA puso de manifiesto que el tratamiento con ISIS 281625 reducía la proteína apolipoproteína B humana en el suero en 31, 26, 11 y 26% a las 2, 4, 6 y 8

semanas, respectivamente, con respecto a los animales tratados con disolución salina. El tratamiento con ISIS 301012 redujo la proteína apolipoproteína B humana en el suero en 70, 87, 81 y 41% a las 2, 4, 6 y 8 semanas, respectivamente, con respecto a los animales de control tratados con disolución salina. El suero de los ratones transgénicos también se sometió a análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos específicos contra apolipoproteína B tanto humana como de ratón (US Biologicals, Swampscott, MA y Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, respectivamente). El análisis de inmunotransferencia de las muestras de suero tomadas de los animales, muestra un patrón similar de expresión de la apolipoproteína B humana, con una reducción significativa en el suero de la proteína apolipoproteína B después de 2, 4 y 6 semanas de tratamiento y una ligera reducción a las 8 semanas. La apolipoproteína B de ratón en el suero no cambió significativamente, de acuerdo con el análisis de inmunotransferencia.

Ejemplo 48

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

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

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

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

Tabla 25

Efectos de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B humana o de ratón en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B, enzimas hepáticas, colesterol y triglicéridos.

	Disolución salina	N° de ISIS				
		233172	233175	281625	301012	301027
Enzimas hepáticas						
AST IU/l	104,5	94,3	346,7	89,5	50,6	455,3
ALT IU/l	39,5	43,3	230,2	36,2	21,2	221,3
Peso corporal	21,2	21,3	21,5	20,9	21,3	21,2
Hígado	1,1	1,3	1,4	1,2	1,1	1,3
Bazo	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Ejemplo 49

Evaluación de la evolución del oligonucleótido con dos dosis diferentes

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

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

Para ISIS 281625 y ISIS 301012, los niveles de AST y ALT permanecieron cercanos a los de la disolución salina, con cualquiera de las dosis después de 2 semanas. Después 4 semanas, los niveles de AST y ALT mostraron un



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

5 Tabla 26

Niveles de AST y ALT en ratones tratados con ISIS 281625, 301012 ó 301027 después de 2 y 4 semanas

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

Ejemplo 50

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

10 La leptina es una hormona producida por la grasa que regula el apetito. Las deficiencias en esta hormona tanto en seres humanos como en animales no humanos, conduce a la obesidad. Los ratones ob/ob tienen una mutación en el gen de la leptina que da como resultado leptina e hiperglucemia. Como tal, estos ratones son un modelo útil para la investigación de la obesidad y la diabetes, y los tratamientos diseñados para tratar estas afecciones.

15 Ratones ob/ob que recibía una dieta alta en grasa, alta en colesterol (60% de kcal de grasa complementada con 0,15% de colesterol) se trataron con uno de los varios oligonucleótidos para evaluar su efecto en los criterios de valoración fenotípicos relacionados con la apolipoproteína B en ratones ob/ob. Después de ayunar durante la noche, se administró a los ratones de cada grupo por vía intraperitoneal, dos veces por semana, 50 mg/kg de ISIS 147483 (SEQ ID No: 79) o 147764 (SEQ ID NO: 109) o los controles ISIS 116847 (SEQ ID NO: 857) o 141923 (SEQ ID NO: 858) o disolución salina, durante 6 semanas. Al terminar el estudio y 48 h después de las inyecciones finales, los

20 animales se sacrificaron y se evaluaron los niveles de ARNm diana en el hígado, niveles de colesterol y triglicéridos, niveles de enzimas hepáticas, niveles de glucosa en el suero y niveles de PTEN.

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

Tabla 27

25 Efectos del tratamiento con ISIS 147483 y 147764 en ratones ob/ob en los niveles de ARNm de apolipoproteína B, colesterol, lípidos, triglicéridos, enzimas hepáticas, glucosa y PTEN.

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

## Ejemplo 51

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

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

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

Tabla 28

20 Correlación entre la concentración de fármaco en el hígado, la expresión de ARNm de la apolipoproteína B y los lípidos en el suero durante el tratamiento con ISIS 147764

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

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

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

Tabla 29

Correlación entre la concentración de fármaco en el hígado, expresión de ARNm de la apolipoproteína B y lípidos en el suero después de cesar la dosificación

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

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

Ejemplo 52

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

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

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

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

Tabla 30

- 30 Reducción de la apolipoproteína B humana en el suero de ratones transgénicos después del tratamiento con ISIS 301012

Dosis de oligonucleótido mg/kg	% de reducción en la proteína apolipoproteína B en el suero				
	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas	12 semanas
10	76	78	73	42	85
25	80	87	86	47	79

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

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

Tabla 31

Efectos de ISIS 301012 en los lípidos del suero en ratones transgénicos con apolipoproteína B humana

	Tratamiento	Periodo de tratamiento				
		Inicio	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
Colesterol total mg/dl	Disolución salina	120	110	129	121	126
	10	115	97	111	120	122
	25	107	101	107	124	147
Colesterol HDL mg/dl	Disolución salina	67	61	69	62	64
	10	70	69	78	72	79
	25	64	73	76	80	91
Colesterol LDL mg/dl	Disolución salina	39	41	50	45	47
	10	35	20	23	37	33
	25	33	19	19	37	44

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

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

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

Tabla 32

Efectos de ISIS 301012 en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B humana y de ratón en ratones transgénicos

especies de ARNm medidas	% inhibición	
	Dosis de ISIS 301012	
	10 mg/kg	25 mg/kg
apolipoproteína B humana	65	75
apolipoproteína B de ratón	6	6

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

de la apolipoproteína B humana, tanto de la forma apolipoproteína B-100 como de la apolipoproteína B-48, en los hígados de ratones transgénicos. El análisis de inmunotransferencia usando un anticuerpo dirigido contra la proteína apolipoproteína B de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) pone de manifiesto que la expresión de la proteína de ratón en el hígado no cambia significativamente.

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

Ejemplo 53

- 10 Evaluación de los efectos inmunoestimuladores in vitro de ISIS 301012

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

- 25 Ejemplo 54

Análisis comparativo genómico de la apolipoproteína B

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

35 El sitio de unión para ISIS 301012 está dentro de la región codificante, en el exón 22 del ARNm de la apolipoproteína B humana. Cuando se compararon los sitios de unión de ISIS 301012 de ser humano, ratón y mono, se observó una diversidad de secuencia significativa. Aunque la conservación total de la secuencia entre la de ser humano y la de mono a lo largo de la región de 500 nucleótidos era aproximadamente de 96%, el sitio de unión de ISIS 301012 de la secuencia de mono contiene 2 apareamientos erróneos con respecto a la secuencia humana. 40 Igualmente, aunque la secuencia de ARNm de la apolipoproteína B de ratón tiene una homología de aproximadamente 81% con la humana, en el sitio de unión de ISIS 301012, hay 5 nucleótidos divergentes. Las comparaciones de secuencias para el sitio de unión de ISIS 301012 para las secuencias de la apolipoproteína B humana, de ratón y de mono se muestran en la tabla 33. Los nucleótidos mal apareados con respecto a la secuencia diana de ISIS 301012 están subrayados.

- 45 Tabla 33

Comparación del sitio de unión de ISIS 301012 entre las secuencias de apolipoproteína B humana, de mono y de ratón

Especies	nº de apareamientos erróneos	secuencia diana de ISIS 301012
Ser humano	0	aggtgcaagcagactgagg
Mono	2	aggtg <u>ta</u> aagcagactgagg
Ratón	5	aggag <u>tg</u> cagcag <u>ct</u> gaag

50 La secuencia diana con la que el oligonucleótido antisentido de ratón ISIS 147764 hibrida está en el exón 24 del gen de la apolipoproteína B de ratón. Las comparaciones de secuencias para el sitio de unión de ISIS 147764 en las secuencias de la apolipoproteína B de ratón y humana, se muestran en la tabla 34. Los nucleótidos mal apareados

con respecto a la secuencia diana de ISIS 147764 están subrayados.

Tabla 34

Comparación del sitio de unión de ISIS 147764 entre las secuencias de apolipoproteína B de ratón y humana

Especies	nº de apareamientos erróneos	sitio de unión de ISIS 147764
Ser humano	5	<u>gcattgacatdttcagggac</u>
Ratón	0	gcatggacttctctgga

## 5 Ejemplo 55

### Análisis BLAST de ISIS 301012

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

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

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

## Ejemplo 56

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

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

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

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

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

Tabla 35

Inhibición del ARNm de la apolipoproteína B por oligonucleótidos antisentido en hepatocitos primarios humanos

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

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

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

10 Tabla 36

Inhibición de la secreción de la proteína apolipoproteína B de hepatocitos humanos primarios por ISIS 301012

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

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

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

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

Tabla 37

Inhibición antisentido del ARNm de la apolipoproteína B humana por ISIS 271009, ISIS 281625 y ISIS 301027

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

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

## Ejemplo 57

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

- 10 La lipoproteína (a) [Lp(a)] contiene dos proteínas distintas unidas por disulfuro, la apolipoproteína (a) y la apolipoproteína B (Rainwater and Kammerer, *J. Exp. Zool.*, 1998, 282, 54-61). Se ensayaron los efectos de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B en la expresión del componente apolipoproteína (a) de la partícula de lipoproteína (a) en hepatocitos humanos primarios.

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

- 20 Las sondas y cebadores para la apolipoproteína (a) humana se diseñaron para hibridar con una secuencia de apolipoproteína (a) humana, usando la información de la secuencia publicada (número de acceso en GenBank NM\_005577.1, incorporada en la presente memoria como SEQ ID NO: 860). Para la apolipoproteína (a) humana los cebadores de la PCR eran:

cebador directo: CAGCTCCTTATTGTTATACGAGGGA (SEQ ID NO: 861)

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

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

Tabla 38

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

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



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

Ejemplo 58

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

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

- 10 Hepatocitos humanos primarios (InVitro Technologies, Baltimore, MD), cultivados y transfectados como se describe en la presente memoria, se trataron durante 24 h con 50 ó 150 nM de ISIS 271009 (SEQ ID NO: 319), 281625 (SEQ ID NO: 224), 301012 (SEQ ID NO: 247) o 301027 (SEQ ID NO: 262). Las células también se trataron con concentración 150 nM de los oligonucleótidos de control ISIS 113529 (SEQ ID NO: 859) o ISIS 13650 (SEQ ID NO: 806). Las células no tratadas sirvieron de control. Después de 24 h de tratamiento con el oligonucleótido, se midió la cantidad de lipoproteína (a) en el medio de cultivo recogido de las células tratadas, usando un kit de ELISA disponible en el comercio (ALerCHEK Inc., Portland, ME). Los resultados son la media de 3 experimentos y se expresan como el porcentaje de cambio en la secreción de lipoproteína (a) con respecto a los controles no tratados. Los datos se muestran en la Tabla 39. Un "+" o "-" que preceden al número indica que la secreción de partículas de lipoproteína (a) aumentó o disminuyó, respectivamente, después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B.

Tabla 39

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

Dosis de oligonucleótido	% de cambio en la secreción de lipoproteína (a)					
	nº de ISIS					
	271009	281625	301012	301027	13650	113529
50 nM	-25	-26	-27	-33	N.D.	N.D.
150 nM	-42	-24	-37	-44	+14	+14

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

Ejemplo 59

- 30 Derivados con apareamientos erróneos y truncados de ISIS 301012

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

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

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

Tabla 40

Efectos de los oligonucleótidos con apareamientos erróneos ISIS 301012 y un 2'MOE-oligonucleótido uniforme en la expresión de la apolipoproteína B en células HepG2

n° de ISIS	SECUENCIA	n° de apareamientos erróneos	% de cambio en la expresión del ARNm de la apolipoproteína B		SEQ ID NO
			Dosis de oligonucleótido		
			50	150	
301012	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	0	-44	-75	247
Serie con apareamientos erróneos, oligonucleótidos quiméricos					
332770	GCCTCAGTCTTCTTCGCACC	1	+7	-22	864
332771	GCCTCAGTCTTATTCGCACC	2	+37	+37	865
332772	GCCTCAGTATTATTCGCACC	3	+99	+84	866
332773	GCCTCATTATTATTCGCACC	4	+75	+80	867
332774	GCCTCATTATTATTAGCACC	5	+62	+66	868
332775	GCCTCATTATTATTATCACC	6	-1	+10	869
332776	GCCTAATTATTATTATCACC	7	+10	+20	870
2'-MOE-oligonucleótido uniforme					
332769	GCCTCAGTCTGCTTCGCACC	0	-11	-14	247

- 5 Los resultados del tratamiento de células HepG2 con los compuestos de la tabla 40 ponen de manifiesto que ninguno de los compuestos presenta la inhibición dependiente de la dosis observada después de tratamiento con la secuencia de ISIS 301012 original. ISIS 332770, que tiene solo una sustitución de timidina a citosina en el centro del oligonucleótido, era 3 veces menos potente que ISIS 301012. Sustituciones de nucleótidos adicionales anulan la inhibición antisentido de la expresión de la apolipoproteína B.
- 10 Los oligonucleótidos fosforotioato quiméricos son metabolizados in vivo predominantemente por escisión endonucleolítica. Se diseñó una serie de oligonucleótidos por truncado de la secuencia de ISIS 301012 en incrementos de 1 ó 2 bases desde el extremo 5' y/o 3'. Los oligonucleótidos truncados representan los posibles productos que resultan de la escisión endonucleolítica. Estos compuestos se muestran en la Tabla 41. Los compuestos en la tabla 41 son oligonucleótidos quiméricos ("gápmers") de diferentes longitudes, compuestos de una región de "hueco" central que consiste en 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en ambos extremos por 2'-metoxietil (2'-MOE)nucleótidos. La estructura exacta de cada oligonucleótido quimérico se designa en la tabla 41 como "estructura quimérica". Por ejemplo, una designación 4~10~4 indica que los primeros 4 (los más 5') y los últimos 4 (los más 3') son 2'-MOE-nucleótidos, y los 10 nucleótidos en el hueco son 2'-desoxinucleótidos. Los 2'-MOE-nucleótidos se indican en negrilla. Los enlaces internucleósidos (cadena principal) son fosfodiéster (P=O) entre nucleótidos resaltados; todos los demás enlaces internucleósidos son fosforotioato (P=S).

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

Tabla 41

Efecto de los mutantes truncados de ISIS 301012 en la expresión de la apolipoproteína B en células HepG2

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

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

Ejemplo 60

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

10 Se diseñó una serie de dúplex de ácido nucleico que comprendían los compuestos antisentido de la presente descripción, y sus complementos para dirigirse a la apolipoproteína B y se muestran en la tabla 42. Todos los compuestos de la tabla 42 son oligorribonucleótidos de 20 nucleótidos de longitud con enlaces internucleósidos fosfodiéster (cadena principal) a lo largo del compuesto. Los compuestos se prepararon con extremos romos. La tabla 41 muestra la cadena antisentido de los ARNdc, y la cadena del mismo sentido se sintetiza como complemento de la cadena antisentido. Se muestra que estas secuencias contienen uracilo (U) pero un experto en la técnica apreciará que el uracilo (U) generalmente es sustituido por timina (T) en las secuencias de ADN. El "sitio diana" indica el número del primer nucleótido (más 5') en la secuencia diana particular, al que se une el compuesto. Un subconjunto de los compuestos en la tabla 42 son los equivalentes de ARN de los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente memoria, y cuando se aplique, esto se indica por el nº de ISIS del oligonucleótido de ADN en la columna de "ARN equivalente a nº de ISIS"

15

Tabla 42

ARNdc dirigidos a la apolipoproteína B humana

nº de ISIS	Región	SEQ ID NO DE LA DIANA	SITIO DIANA	Secuencia	SEQ ID NO	ARN equivalente a nº de ISIS
342855	codificante	3	3249	GCCUCAGUCUGCUUCGCACC	247	301012
342856	3' UTR	3	13903	GCUCACUGUAUGGUUUUAUC	262	301027
342857	codificante	3	5589	AGGUUACCAGCCACAUGCAG	224	308361
342858	codificante	3	669	GAGCAGUUUCCAUCACGGU	130	270991
342859	codificante	3	1179	CCUCUCAGCUCAGUAACCAG	135	270996
342860	codificante	3	2331	GUUAAGCCAAAGUGGUCCAC	34	147797
342861	codificante	3	3579	UAAGCUGUAGCAGAUGAGUC	213	281614
342862	5' UTR	3	6	CAGCCCCGCAGGUCCCGGUG	249	301014
342863	5' UTR	3	116	GGUCCAUCGCCAGCUGCGGU	256	301021
342864	3' UTR	3	13910	AAGGCUGGCUCACUGUAUGG	266	301031
342865	3' UTR	3	13970	GCCAGCUUUGGUGCAGGUCC	273	301038
342866	codificante	3	426	UUGAAGCCAUACACCUCUUU	879	Ninguno
342867	codificante	3	3001	UGACCAGGACUGCCUGUUCU	880	Ninguno
342868	codificante	3	5484	GAAUAGGGCUGUAGCUGUAA	881	Ninguno
342869	codificante	3	6662	UAUACUGAUCAAUUGUAUC	882	Ninguno
342870	codificante	3	8334	UGGAAUUCUGGUAUGUGAAG	883	Ninguno
342871	codificante	3	9621	AAAUCAAAUGAUUGCUUUGU	883	Ninguno
342872	codificante	3	10155	GUGAUGACACUUGAUUUAAA	885	Ninguno
342873	codificante	3	12300	GAAGCUGCCUCUUCUCCCA	886	Ninguno
342874	codificante	3	113629	GAGAGUUGGUCUGAAAAAUC	887	Ninguno

- 5 Se ensayaron los efectos de los ARNdc de la tabla 42 en el ARNm de la apolipoproteína humana en células HepG2. Las células HepG2 se trataron con compuestos de ARNdc 100 nM mezclados con LIPOFECTIN 5 µg/ml (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) durante un periodo de 16 h. En el mismo experimento, las células HepG2 también se trataron con un subconjunto de oligonucleótidos antisentido 150 nM descritos en la presente memoria mezclados con LIPOFECTIN 3,75 µg/ml; estos compuestos se indican en la Tabla 43. Los oligonucleótidos de control incluían
- 10 ISIS 18078 (GTGCGCGAGCCCGAAATC, SEQ ID NO: 888). ISIS 18078 es un oligonucleótido quimérico ("gápmero") de 20 nucleótidos de longitud, compuesto de una región de "hueco" central que consiste en 9 2'-desoxinucleótidos, que está flanqueada en los extremos 5' y 3' por un "ala" de 5 nucleótidos y un "ala" de 6 nucleótidos, respectivamente. Las alas están compuestas por 2'-metoxietil (2'-MOE)-nucleótidos. Los enlaces internucleosídicos (cadena principal) son enlaces fosforotioato (P=S) a lo largo de todo el oligonucleótido. Todas las citidinas son 5-metilcitidinas. El dúplex de ISIS 263188 (CUUCUGGCAUCCGGUUUAGTT, SEQ ID NO: 889) y su
- 15 complementario también se usan como control. ISIS 263188 es un oligoribonucleótido de 21 nucleótidos de longitud siendo los 2 nucleótidos del extremo 3'-oligodesoxirribonucleótidos (TT) y con enlaces internucleosido fosfodiéster (cadena principal) a lo largo del compuesto.

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

Tabla 43

Inhibición del ARNm de la apolipoproteína B por los ARNdc en células HepG2

n° de ISIS	Dosis	% inhibición	SEQ ID No
342855	100 nM	53	247
342856	100 nM	34	262
342857	100 nM	55	224
342858	100 nM	44	130
342859	100 nM	23	135
342860	100 nM	34	34
342861	100 nM	42	213
342862	100 nM	16	249
342863	100 nM	34	256
342864	100 nM	53	266
342865	100 nM	50	273
342866	100 nM	12	879
342867	100 nM	26	880
342868	100 nM	36	881
342869	100 nM	78	882
342870	100 nM	71	883
342871	100 nM	9	883
342872	100 nM	2	885
342873	100 nM	53	886
342874	100 nM	73	887
281625	150 nM	79	224
301012	150 nM	77	247
301014	150 nM	88	249
301021	150 nM	67	256
301027	150 nM	79	262
301028	150 nM	85	263
301029	150 nM	77	264
301030	150 nM	70	265
301031	150 nM	73	266
301037	150 nM	80	272
301038	150 nM	84	273
301045	150 nM	77	280
263188	150 nM	26	888
18078	150 nM	13	889

## Ejemplo 61

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

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

ISIS 326358 e ISIS 315089 son los equivalentes del macaco cangrejero de los oligonucleótidos antisentido para la apolipoproteína B humana ISIS 301012 (SEQ ID NO: 247) e ISIS 281625 (SEQ ID NO: 224), respectivamente.

5 Se comparó la inhibición antisentido de ISIS 301012 con la de ISIS 326358, que tiene una correspondencia perfecta con la secuencia de la apolipoproteína B del macaco cangrejero con la que hibrida ISIS 301012. Se analizó el efecto de los compuestos en los niveles de ARNm de la apolipoproteína B del macaco cangrejero en hepatocitos primarios de macaco cangrejero adquiridos in Vitro Technologies (Gaithersburg, MD). Los hepatocitos primarios de macaco cangrejero precultivados en placa se adquirieron en InVitro Technologies (Baltimore, MD). Las células se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) complementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), 100 unidades/ml y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA).

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

Tabla 44

Inhibición del ARNm de la apolipoproteína B del macaco cangrejero por ISIS 301012 e ISIS 326358

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

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

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

Tabla 45

30 Reducción de la proteína apolipoproteína B secretada por hepatocitos de macaco cangrejero después de tratamiento con oligonucleótido antisentido

		% de reducción de la proteína apolipoproteína B secretada		
		nº de ISIS		
Dosis de oligonucleótido	Tiempo de tratamiento (horas)	326358	301012	113529
150 nM	24	21	31	11
	48	29	25	18
300 nM	24	17	10	12
	48	35	17	8

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

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

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

Tabla 46

Inhibición antisentido de la expresión del ARNm de la apolipoproteína B en hepatocitos de macaco cangrejero

Dosis de oligonucleótido	% de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B			
	n° de ISIS			
	315089	281625	13650	113529
10 nM	70	+5	N.D.	N.D.
50 nM	83	41	N.D.	N.D.
150 nM	81	35	+50	N.D.
300 nM	82	69	33	28

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

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

30 Tabla 47

Reducción de la proteína apolipoproteína B secretada por hepatocitos de macaco cangrejero después de tratamiento con oligonucleótido antisentido

Dosis de oligonucleótido	% de reducción de la secreción de proteína apolipoproteína B de mono			
	n° de ISIS			
	315089	281625	13650	113529
50 nM	11	6	16	N.D.
150 nM	25	13	13	12

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

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

experimentos y se expresan como porcentaje de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B normalizados con respecto a las células de control no tratadas.

Tabla 48

Inhibición antisentido de la expresión del ARNm de la apolipoproteína B en hepatocitos de macaco cangrejero

Dosis de oligonucleótido	% de inhibición del ARNm de la apolipoproteína B		
	n° de ISIS		
	271009	301027	113529
10 nM	42	40	N.D.
50 nM	66	54	N.D.
150 nM	69	67	11

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

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

Tabla 49

15 Reducción de la proteína apolipoproteína B secretada por hepatocitos de macaco cangrejero después de tratamiento con oligonucleótido antisentido

Dosis de oligonucleótido	% de reducción de la secreción de proteína apolipoproteína B de mono			
	n° de ISIS			
	271009	301027	13650	113529
50 nM	+30	25	N.D.	N.D.
150 nM	26	31	+1	15

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

Ejemplo 62

Métodos para evaluar la esteatosis hepática

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

30 El tejido reseccionado del hígado se sumerge inmediatamente en compuesto de inmersión Tissue Tek OCT (Ted Pella, Inc., Redding, CA) y se congela en una suspensión de hielo seco de 2-metil-butano. Las secciones de tejido se cortan con un grosor de 4-5 µm y después se fijan en formalina tamponada neutra al 5%. Las secciones de tejido se tiñen con hematoxilina y eosina siguiendo procedimientos histológicos estándar para visualizar los núcleos y citoplasma, respectivamente, y rojo oleoso O de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Newcomers Supply, Middleton, WI) para visualizar los lípidos.

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

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



## Ejemplo 63

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

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

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

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

## Ejemplo 64

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

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

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

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

ensayo GPO de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

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

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

Tabla 50

Efectos de la inhibición antisentido por ISIS 301012 en macacos cangrejeros magros:

		Administración intravenosa			Inyección subcutánea	
		2 mg/kg	4 mg/kg	12 mg/kg	3,5 mg/kg	20 mg/kg
% de cambio de la expresión de la apolipoproteína B normalizado respecto a la disolución salina		-45	-76	-96	N.D.	-94
Concentración del oligonucleótido antisentido µg/g		92	179	550	N.D.	855
Parámetros lipídicos, % de cambio normalizado frente al valor de referencia no tratado	Disolución salina	2 mg/kg	4 mg/kg	12 mg/kg	3,5 mg/kg	20 mg/kg
Colesterol total	+1	-6	-2	-2	+5	-5
Colesterol LDL	+17	+15	+9	+3	-4	-16
Colesterol HDL	-11	-23	-15	-8	+13	+5
LDL/HDL	+62	+94	+38	+44	-15	-19
Colesterol total/HDL	+30	+44	+22	+21	-7	-10
Triglicérido	+37	+26	+32	+15	+1	-3
Concentración de partículas de LDL	+15	+8	+8	-11	-14	-21

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

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

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

## Ejemplo 65

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

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

15 Para el análisis de micromatrices de ADN, se prepararon muestras de hibridación a partir de 10 µg de ARN total aislado de cada hígado de ratón de acuerdo con el manual técnico de análisis de expresión de Affymetrix (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Las muestras se hibridaron con un chip de genes de ratón que contenía aproximadamente 22.000 genes, que posteriormente se lavó, se tiñó doblemente usando Fluidics Station 400 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) como define el protocolo del fabricante. Se hizo un barrido de los chips teñidos de la intensidad celular de la sonda con el escáner GeneArray (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Se calcularon los valores de las señales de cada conjunto de sondas usando el software de Affymetrix Microarray Suite v5.0 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA). Se hizo el perfil de cada condición a partir de 5 muestras biológicas por grupo, un chip por muestra. El número de cambios de la expresión se computó usando la media geométrica de los valores de la señal Microarray Suite v5.0. El análisis estadístico usaba ANOVA de una vía seguido de 9 comparaciones por parejas. Todos los grupos se compararon con el grupo de alto contenido de grasa para determinar los cambios en la expresión génica que resultan del tratamiento con ISIS 147764. Los datos de las micromatrices se interpretaron usando una agrupación jerárquica para visualizar los patrones de expresión génica globales.

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

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

## Ejemplo 66

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

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

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

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

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

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

Evaluación de la estosis en ratones magros

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

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

Tabla 51

Inhibición antisentido de ARNm de la apolipoproteína B en ratones magros

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

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

Tabla 52

Niveles de lípidos y enzimas hepáticas en el suero en ratones magros tratados con ISIS 147764 e ISIS 147483

	Tratamiento y dosis				
	Disolución salina	ISIS 147483		ISIS 147764	
		25	50	25	50
		mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Lípidos en el suero					
Colesterol total mg/dl	164	153	183	114	57
Colesterol LDL mg/dl	25	26	39	29	18
Colesterol HDL mg/dl	127	117	131	79	38
Triglicéridos mg/dl	121	138	127	80	30
Enzimas hepáticas					
ALT IU/l	105	73	57	47	48
AST IU/l	109	78	72	81	101

35 Se preparó tejido hepático por métodos histológicos rutinarios para evaluar la estosis, como se describe en la presente memoria. El examen de muestras de tejido teñidas con rojo oleoso O o hematoxilina y eosina, pone de

manifiesto que el tratamiento de ratones magros con oligonucleótidos antisentido para apolipoproteína B no produce estosis.

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

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

Ejemplo 67

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

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

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

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

Ejemplo 68

- 55 Modelos de conejo para estudiar la formación de placa aterosclerótica

Se usa la variedad de conejo Watanabe con hiperlipidemia heredable (WHHL) como modelo para la formación de placa aterosclerótica. También se usaron conejos blancos de Nueva Zelanda con una dieta con alto contenido en grasa como modelo de la formación de placa aterosclerótica. El tratamiento de los conejos WHHL o los conejos

blancos de Nueva Zelanda alimentados con alto contenido en grasa, con compuestos antisentido para la apolipoproteína B, se usa para ensayar su potencial como tratamientos terapéuticos o profilácticos para la enfermedad de placa aterosclerótica. Se inyecta a los conejos 5, 10, 25 ó 50 mg/kg de oligonucleótidos antisentido dirigidos a la apolipoproteína B. Los animales tratados con disolución salina sola o un oligonucleótido de control sirven como controles. A lo largo del tratamiento se recogen muestras de suero y se evalúan los niveles de proteína apolipoproteína B por ELISA (kit de ALerCHEK Inc., Portland, ME) y los lípidos en el suero (colesterol, colesterol LDL, colesterol VLDL, colesterol HDL, triglicéridos) por análisis clínico rutinario. El contenido de triglicéridos del tejido hepático se mide usando un ensayo GPO de triglicéridos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Se obtienen tejidos de hígado, riñón, corazón, aorta y otros tejidos y se procesan para el análisis histológico usando procedimientos rutinarios. Se examina en los tejidos de hígado y riñón las pruebas de gránulos basófilos e infiltrados inflamatorios. Se evalúa en el tejido hepático la esteatosis usando tinte con rojo oleoso O. Además, se examinan secciones aórticas teñidas con rojo oleoso O y hematoxilina para evaluar la formación de lesiones ateroscleróticas.

#### Ejemplo 69

##### Suministro oral de inhibidores de la apolipoproteína B

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

comprende de aproximadamente 6 a aproximadamente 16, p. ej. de aproximadamente 8 a aproximadamente 16 desoxinucleósidos consecutivos.

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

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

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

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

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

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

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

En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos para el suministro oral comprenden al menos dos



fases discretas, cuyas fases pueden comprender partículas, cápsulas, cápsulas de gel, microesferas, etc. Cada fase puede contener uno o más oligonucleótidos, potenciadores de la penetración, tensioactivos, bioadhesivos, agentes efervescentes, u otros adyuvantes, excipientes o diluyentes. En algunas realizaciones, una fase comprende al menos un oligonucleótidos y al menos un potenciador de la penetración. En algunas realizaciones, una primera fase comprende al menos un oligonucleótido y al menos un potenciador de la penetración, mientras que una segunda fase comprende al menos un potenciador de la penetración. En algunas realizaciones, una primera fase comprende al menos un oligonucleótido y al menos un potenciador de la penetración, mientras que una segunda fase comprende al menos un potenciador de la penetración y sustancialmente no comprende oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos una fase se mezcla con al menos un retardante de la degradación, tal como un recubrimiento o una matriz, que retrasa la liberación del contenido de esta fase. En algunas realizaciones, al menos una fase, en algunas realizaciones, una primera fase comprende al menos un oligonucleótido, al menos un potenciador de la penetración, mientras que una segunda fase comprende al menos un potenciador de la penetración y un retardante de la liberación. En realizaciones particulares, un oligonucleótido oral comprende una primera fase que comprende partículas que contienen un oligonucleótido y un potenciador de la penetración, y una segunda fase que comprende partículas recubiertas con un agente retardante de la liberación y contienen potenciador de la penetración.

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

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

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

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

También se pueden añadir agentes que potencian la captación de oligonucleótidos a nivel celular a las composiciones farmacéuticas y otras composiciones de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar lípidos catiónicos tales como la lipofectina (Junichi et al., patente de EE.UU. nº 5.705.188), derivados de glicerol catiónicos y moléculas policatiónicas, tales como polilisina (Lollo et al., solicitud PCT WO 97/30731).

- 5 Algunas composiciones de oligonucleótidos orales también incorporan compuesto vehículo en la formulación. Como se usa en la presente memoria, el "compuesto vehículo" o "vehículo" se puede referir a un ácido nucleico o análogo del mismo, que puede ser inerte (es decir, no tiene actividad biológica por sí mismo) o puede ser necesario para el transporte, reconocimiento o ruta de activación o mediación, o es reconocido como un ácido nucleico por procesos in vivo que reducen la biodisponibilidad del ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, degradando el
- 10 ácido nucleico biológicamente activo o promoviendo su eliminación de la circulación. La coadministración de un ácido nucleico y un compuesto vehículo, típicamente con un exceso de esta última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperado en el hígado, riñón u otros depósitos extracirculatorios, supuestamente debido a la competición entre el compuesto vehículo y el ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un oligonucleótido parcialmente fosforotioato en tejido hepático se
- 15 puede reducir cuando se coadministra con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policítidico o ácido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-2,2'-disulfónico (Miyao et al., *Antisense Res. Dev.*, 1995, 5, 5; Takakura et al., *Antisense & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177).

Un "vehículo farmacéutico" o un "excipiente" puede ser un disolvente farmacéuticamente aceptable, un agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o varios ácidos nucleicos a un

20 animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la forma de administración planeada en mente, de modo que proporcione el volumen, consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Los vehículos farmacéuticos típicos incluyen, pero sin limitar, agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (p. ej., lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa,

25 poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato sódico, acetato sódico, etc.); disgregantes (p. ej., almidón, glicolato sódico de almidón, EXPLOTAB); y agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato sódico, etc.).

Las composiciones orales de oligonucleótidos pueden contener adicionalmente otros componentes auxiliares encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles, farmacéuticamente activos tales como, por ejemplo, agentes antiprurífticos, astringentes, anestésicos locales o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas farmacéuticas de la

30 composición de la presente invención, tales como colorantes, agentes de sabor, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, dichos materiales, cuando se añaden, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. A continuación se describen realizaciones adicionales de la invención:

1. Un compuesto antisentido de 8 a 50 bases nucleicas de longitud, en el que dicho compuesto específicamente hibrida con los nucleótidos 2920-3420 expuestos en la SEQ ID NO: 3 e inhibe la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B humana después de 16 a 24 h en al menos 30%, en células HepG2 al 80% de confluencia en un cultivo en una concentración 150 nM.
- 40 2. El compuesto antisentido de la realización 1, en el que dicho compuesto específicamente hibrida con los nucleótidos 3230-3288 expuestos en la SEQ ID NO: 3 e inhibe la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B humana después de 16 a 24 h en al menos 30%, en células HepG2 al 80% de confluencia en un cultivo en una concentración 150 nM.
- 45 3. El compuesto antisentido de la realización 2, que es un oligonucleótido antisentido.
4. El compuesto antisentido de la realización 3, en el que el oligonucleótido antisentido es un compuesto mimético de oligonucleótido.
5. El compuesto antisentido de la realización 2, de 12 a 30 bases nucleicas de longitud.
- 50 6. El compuesto antisentido de la realización 5, de 14 a 20 bases nucleicas de longitud.
7. El compuesto antisentido de la realización 4, en el que el compuesto mimético de oligonucleótido comprende al menos un enlace fosforotioato.
8. El compuesto antisentido de la realización 4, en el que el compuesto mimético de oligonucleótido comprende al menos un resto de 2'-O-metoxietil-azúcar.
- 55 9. El compuesto antisentido de la realización 4, en el que el compuesto mimético de oligonucleótido comprende al menos una 5-metilcitosina.

10. El compuesto antisentido de la realización 2, en el que el compuesto antisentido es un compuesto antisentido quimérico.
11. El compuesto antisentido de la realización 10, en el que el compuesto antisentido quimérico es un compuesto antisentido fosforotioato quimérico.
- 5 12. El compuesto antisentido de la realización 11, en el que el compuesto antisentido fosforotioato quimérico comprende alas de 2'-metoxietoxil-nucleótido y un hueco de 2'-desoxinucleótidos.
13. El compuesto antisentido de la realización 12, en el que el compuesto antisentido fosforotioato quimérico comprende 10 2'-desoxinucleótidos.
- 10 14. El compuesto antisentido de una cualquiera de las realizaciones 1-13, en el que dicho compuesto antisentido inhibe la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B humana después de 16 a 24 h en al menos 50%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivo en una concentración 150 nM.
15. El compuesto antisentido de una cualquiera de las realizaciones 1-13, en el que al menos una base nucleica está covalentemente unida a un conjugado.
- 15 16. Una composición que comprende el compuesto antisentido de una cualquiera de las realizaciones 1-13, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
17. La composición de la realización 16, que además comprende un sistema de dispersión coloidal.
18. Una composición que comprende un compuesto antisentido de cualquiera de las realizaciones 1-13, hibridado con una cadena complementaria.
- 20 19. La composición de la realización 18, en la que la hibridación del compuesto antisentido con la cadena complementaria forma al menos un extremo romo.
20. La composición de la realización 19, en la que la hibridación del compuesto antisentido con la cadena complementaria forma al menos dos extremos romos.
21. Un compuesto oligonucleótido antisentido de 8 a 50 base nucleicas de longitud, que comprende al menos 8 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 247.
- 25 22. El compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 21, en el que el compuesto oligonucleótido antisentido tiene una secuencia que comprende la SEQ ID NO: 247.
23. El compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 22, de 12 a 30 bases nucleicas de longitud.
24. El compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 23, de 14 a 20 bases nucleicas de longitud.
- 30 25. El compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 24, en el que el compuesto oligonucleótido antisentido tiene una secuencia que consiste en la SEQ ID NO: 247.
26. El compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 25, en el que el compuesto oligonucleótido antisentido es un compuesto mimético de oligonucleótido.
27. El compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 26, en el que el compuesto mimético de oligonucleótido es un compuesto oligonucleótido fosforotioato quimérico.
- 35 28. El compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 27, en el que el compuesto oligonucleótido fosforotioato quimérico comprende alas de 2'-metoxietoxil-nucleótido y un hueco de 2'-desoxinucleótidos.
29. El compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 28, en el que el compuesto oligonucleótido fosforotioato quimérico comprende 10 2'-desoxinucleótidos.
- 40 30. El compuesto oligonucleótido antisentido de una cualquiera de las realizaciones 21-29, en el que al menos un oligonucleótido está covalentemente unido a un conjugado.
31. Una composición que comprende el compuesto oligonucleótido antisentido de una cualquiera de las realizaciones 21-29, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
32. La composición de la realización 31, que además comprende un sistema de dispersión coloidal.
- 45 33. Una composición que comprende un compuesto oligonucleótido de cualquiera de las realizaciones 22-29, hibridado con una cadena complementaria.
34. La composición de la realización 33, en la que la hibridación del compuesto oligonucleótido con la cadena

complementaria forma al menos un extremo romo.

35. La composición de la realización 34, en la que la hibridación del compuesto oligonucleótido con la cadena complementaria forma al menos dos extremos romos.

5 36. Un método para inhibir la expresión de la apolipoproteína B en células o tejidos, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un compuesto de la realización 2, en condiciones tales que se inhiba la expresión de la apolipoproteína B.

37. Un método para inhibir la expresión de la apolipoproteína B en células o tejidos, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un compuesto de la realización 21, en condiciones tales que se inhiba la expresión de la apolipoproteína B.

10 38. El método de la realización 36 o realización 37, en el que las células o tejidos se ponen en contacto in vivo.

39. El método de la realización 38, en el que dicho contacto comprende la etapa de administrar el compuesto a un animal.

40. El método de la realización 39, en el que el animal es un ser humano.

15 41. El método de la realización 40, en el que el ser humano tiene una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B, y se administra una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto.

42. El método de la realización 41, en el que el ser humano tiene una afección asociada con el metabolismo anómalo de lípidos.

20 43. El método de la realización 41, en el que el ser humano tiene una afección asociada con el metabolismo anómalo del colesterol.

44. El método de la realización 41, en el que el ser humano tiene una enfermedad cardiovascular.

45. El método de la realización 44, en el que la enfermedad cardiovascular es la aterosclerosis.

46. El método de la realización 41, en el que el ser humano tiene una afección metabólica anómala asociada con la expresión de la apolipoproteína B.

25 47. El método de la realización 46, en el que la afección metabólica anómala es la hiperlipidemia.

48. El método de la realización 41, en el que el ser humano tiene diabetes.

49. El método de la realización 41, en el que el ser humano es obeso.

50. El método de la realización 40, en el que se administra una cantidad eficaz del compuesto para prevenir una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B.

30 51. El método de la realización 40, en el que se administra una cantidad eficaz del compuesto para retrasar una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B.

52. Un método para prevenir o retrasar el inicio de un aumento de los niveles de glucosa en un animal, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de la realización 1.

35 53. Un método para prevenir o retrasar el inicio de un aumento de los niveles de glucosa en un animal, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de la realización 22.

54. El método de la realización 52 o realización 53, en el que el animal es un ser humano.

55. El método de la realización 54, en el que los niveles de glucosa son niveles de glucosa en el suero o el plasma.

40 56. Un método para modular los niveles de colesterol en el suero en un animal, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de la realización 1 ó 21.

57. El método de la realización 56, en el que el animal es un ser humano.

58. Un método para modular los niveles de lipoproteína en un animal, que comprende administrar a dicho animal una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de la realización 1.

45 59. Un método para modular los niveles de lipoproteína en un animal, que comprende administrar a dicho animal

- una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de la realización 22.
60. El método de la realización 58 o realización 59, en el que el animal es un ser humano.
61. El método de la realización 60, en el que la lipoproteína es VLDL.
62. El método de la realización 60, en el que la lipoproteína es HDL.
- 5 63. El método de la realización 60, en el que la lipoproteína es LDL.
64. El método de una cualquiera de las realizaciones 39, 52, 53, 56, 58 y 59, en el que el compuesto se administra por vía intravenosa.
65. El método de una cualquiera de las realizaciones 39, 52, 53, 56, 58 y 59, en el que el compuesto se administra por vía subcutánea.
- 10 66. Un compuesto oligonucleótido antisentido de 20 bases nucleicas de longitud que tiene una secuencia de bases nucleicas como se expone en la SEQ ID NO: 247 y que comprende 5-metilcitosina en las bases nucleicas 2, 3, 5, 9, 12, 15, 17, 19 y 20, en el que cada enlace internucleósido es un enlace fosforotioato, las bases nucleicas 1-5 y 16-20 comprenden una modificación 2'-metoxietoxilo, y las bases nucleicas 6-15 son desoxinucleótidos.
- 15 67. El compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 66, en el que un oligonucleótido está covalentemente unido a un conjugado.
68. Una composición que comprende el compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 66, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
69. La composición de la realización 68, que además comprende un sistema de dispersión coloidal.
- 20 70. Una composición que comprende el compuesto oligonucleótido antisentido de la realización 66, hibridado con una cadena complementaria.
71. Un método para inhibir la expresión de la apolipoproteína B en células o tejidos, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con un compuesto de la realización 66, de modo que se inhiba la expresión de la apolipoproteína B.
72. El método de la realización 72 o realización 71, en el que las células o tejidos se ponen en contacto in vivo.
- 25 73. El método de la realización 72, en el que dicho contacto comprende la etapa de administrar el compuesto a un animal.
74. El método de la realización 73, en el que el animal es un ser humano.
75. El método de la realización 74, en el que el ser humano tiene una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B, y se administra una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto.
- 30 76. El método de la realización 75, en el que el ser humano tiene una afección asociada con el metabolismo anómalo de lípidos.
77. El método de la realización 75, en el que el ser humano tiene una afección asociada con el metabolismo anómalo del colesterol.
- 35 78. El método de la realización 75, en el que el ser humano tiene una enfermedad cardiovascular.
79. El método de la realización 78, en el que la enfermedad cardiovascular es la aterosclerosis.
80. El método de la realización 75, en el que el ser humano tiene una afección metabólica anómala asociada con la expresión de la apolipoproteína B.
81. El método de la realización 80, en el que la afección metabólica anómala es la hiperlipidemia.
- 40 82. El método de la realización 75, en el que el ser humano tiene diabetes.
83. El método de la realización 75, en el que el ser humano es obeso.
84. El método de la realización 74, en el que se administra una cantidad eficaz del compuesto para prevenir una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B.
- 45 85. El método de la realización 74, en el que se administra una cantidad eficaz del compuesto para retrasar una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B.

86. Un método para prevenir o retrasar el inicio de un aumento de los niveles de glucosa en un ser humano, que comprende administrar a dicho ser humano una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de la realización 66.
87. El método de la realización 86, en el que los niveles de glucosa son niveles de glucosa en el suero.
- 5 88. El método de la realización 86, en el que los niveles de glucosa son niveles de glucosa en el plasma.
89. Un método para modular los niveles de colesterol en el suero en un ser humano, que comprende administrar a dicho ser humano una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de la realización 66.
90. Un método para modular los niveles de lipoproteína en un ser humano, que comprende administrar a dicho ser humano una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto de la realización 66.
- 10 91. El método de la realización 90, en el que la lipoproteína es VLDL.
92. El método de la realización 90, en el que la lipoproteína es HDL.
93. El método de la realización 90, en el que la lipoproteína es LDL.
94. El método de una cualquiera de las realizaciones 73-93, en el que el compuesto se administra por vía intravenosa.
- 15 95. El método de una cualquiera de las realizaciones 73-93, en el que el compuesto se administra por vía subcutánea.
96. El método de una cualquiera de las realizaciones 73-93, en el que el compuesto se administra por vía oral.
97. Un kit que comprende un compuesto de una cualquiera de las realizaciones 1-15, 21-30 y 66-67.
- 20 98. Un compuesto que comprende una primera cadena de bases nucleicas hibridada con una segunda cadena de bases nucleicas, cada cadena de 8 a 50 bases nucleicas de longitud, comprendiendo dicha primera cadena de bases nucleicas una secuencia de al menos 8 bases nucleicas contiguas de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3, comprendiendo dicha segunda cadena de bases nucleicas una secuencia suficientemente complementaria de dicha primera cadena para permitir la hibridación estable, inhibiendo dicho compuesto la expresión del ARNm de la apolipoproteína B humana después de 16 a 24 h en al menos 30%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivo en una concentración 100 nM.
- 25 99. El compuesto de la realización 98, en el que la primera cadena comprende una secuencia de 12 a 30 bases nucleicas contiguas de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.
100. El compuesto de la realización 98, en el que la primera cadena comprende una secuencia de 20 bases nucleicas contiguas de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.
- 30 101. El compuesto de las realizaciones 98, 99 ó 100, en el que la segunda cadena comprende una secuencia perfectamente complementaria de al menos 8 bases nucleicas contiguas de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.
102. El compuesto de la realización 101, en el que la segunda cadena comprende una secuencia perfectamente complementaria de 12 a 30 bases nucleicas de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.
- 35 103. El compuesto de la realización 101, en el que la segunda cadena comprende una secuencia perfectamente complementaria de 20 bases nucleicas de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3.
104. El compuesto de cualquiera de las realizaciones 98-103, en el que al menos una cadena comprende ARN.
105. El compuesto de cualquiera de las realizaciones 98-104, en el que al menos una cadena comprende uno o más desoxinucleósidos.
- 40 106. El compuesto de cualquiera de las realizaciones 98-105, en el que las cadenas hibridadas forman al menos un extremo saliente.
107. El compuesto de la realización 106, en el que el extremo saliente comprende al menos una base modificada.
- 45 108. El compuesto de cualquiera de las realizaciones 98-107, en el que dicho compuesto inhibe la expresión del ARNm que codifica la apolipoproteína B humana después de 16 a 24 h en al menos 50%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivo en una concentración 100 nM.
109. Una vesícula que comprende un compuesto de cualquiera de las realizaciones 98-108.

110. La vesícula de la realización 109, en la que la vesícula es un liposoma.
111. Una composición que comprende el compuesto de una cualquiera de las realizaciones 98-108, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
112. La composición de la realización 111, que además comprende un sistema de dispersión coloidal.
- 5 113. Un método para inhibir la expresión de la apolipoproteína B en células o tejidos, que comprende poner en contacto dichas células o tejidos con el compuesto de una cualquiera de las realizaciones 98-108, en condiciones tales que se inhiba la expresión de la apolipoproteína B.
114. El método de la realización 113, en el que las células o tejidos se ponen en contacto in vivo.
115. El método de la realización 114, en el que dicho contacto comprende la etapa de administrar el compuesto a un  
10 animal.
116. El método de la realización 115, en el que el animal es un ser humano.
117. El método de la realización 116, en el que el ser humano tiene una afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B, y se administra una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz del compuesto.
118. El método de la realización 117, en el que dicha afección está asociada con el metabolismo anómalo de lípidos.
- 15 119. El método de la realización 117, en el que dicha afección está asociada con el metabolismo anómalo del colesterol.
120. El método de la realización 117, en el que dicha afección es una la enfermedad cardiovascular.
121. El método de la realización 120, en el que la enfermedad cardiovascular es la aterosclerosis.
122. El método de la realización 117, en el que dicha afección es una afección metabólica anómala asociada con la  
20 expresión de la apolipoproteína B.
123. El método de la realización 122, en el que la afección metabólica anómala asociada con la expresión de la apolipoproteína B es la hiperlipidemia.
124. El método de la realización 117, en el que la afección es la diabetes.
125. El método de la realización 117, en el que la afección es la obesidad.
- 25 126. El método de la realización 116, en el que se administra una cantidad eficaz del compuesto para prevenir una afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B.
127. El método de la realización 126, en el que se administra una cantidad eficaz del compuesto para retrasar una afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B.
128. Un método para reducir la secreción de lipoproteína (a) por hepatocitos, que comprende:
- 30 (a) poner en contacto hepatocitos con una cantidad de una composición que comprende un compuesto no catalítico de 8 a 50 bases nucleicas de longitud, que hibrida específicamente con el ARNm que codifica la apolipoproteína B humana e inhibe la expresión del ARNm después de 16 a 24 h en al menos 30%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivo en una concentración 150 nM, en el que dicha cantidad es eficaz para inhibir la expresión de la apolipoproteína B en los hepatocitos; y
- 35 (b) medir la secreción de la lipoproteína (a) por los hepatocitos.
129. El método de la realización 128, en el que el compuesto no catalítico hibrida específicamente con los nucleótidos 3230-3288 expuestos en la SEQ ID NO: 3.
130. El método de la realización 129, en el que el compuesto no catalítico comprende una secuencia de bases nucleicas como se expone en la SEQ ID NO: 247.
- 40 131. El método de cualquiera de las realizaciones 128-130, en el que el compuesto no catalítico es un mimético de oligonucleótido antisentido.
132. Un método para tratar una afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B humana en un primate, que comprende administrar al primate una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un compuesto no catalítico de 8 a 50 bases nucleicas de longitud que hibrida específicamente con ARNm que codifica la  
45 apolipoproteína B humana e inhibe la expresión del ARNm después de 16 a 24 h en al menos 30%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivo en una concentración 150 nM.

133. El método de la realización 132, en el que el primate es un ser humano.
134. El método de la realización 133, en el que la afección se selecciona del grupo que consiste en metabolismo anómalo de lípidos, metabolismo anómalo del colesterol, enfermedad cardiovascular, hiperlipidemia, diabetes y obesidad.
- 5 135. Un método para reducir la expresión de la apolipoproteína B en el hígado de un animal, que comprende administrar al animal entre 2 mg/kg y 20 mg/kg de un compuesto no catalítico de 8 a 50 bases nucleicas de longitud que hibrida específicamente con el ARNm que codifica la apolipoproteína B humana en al menos 30%, en células HepG2 al 80% de confluencia en cultivos en una concentración 150 nM.
136. El método de la realización 135, en el que el compuesto se administra por vía subcutánea.
- 10 137. El método de la realización 135, en el que el compuesto se administra por vía intravenosa.
138. El método de la realización 135, en el que el compuesto se administra por vía oral.
139. El método de una cualquiera de las realizaciones 135-138, en el que la administración al animal se repite.
140. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 135-139, en el que el animal es un ser humano.
141. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, 21-30, 66-67 y 98-108, en la producción de un medicamento.
- 15 142. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, 21-30, 66-67 y 98-108, en un medicamento para alterar el metabolismo de lípidos.
143. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, 21-30, 66-67 y 98-108, en un medicamento para una enfermedad o afección asociada con la expresión de la apolipoproteína B.
- 20 144. Un método para fabricar un compuesto de una cualquiera de las realizaciones 98-108, que comprende hibridar específicamente in vitro una primera cadena de bases nucleicas que comprende una secuencia de al menos 8 bases nucleicas contiguas de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 3 con una segunda cadena de bases nucleicas que comprende una secuencia suficientemente complementaria de dicha primera cadena de forma que permite la hibridación estable.
- 25 LISTA DE SECUENCIAS
- <110> Genzyme Corporation
- <120> MODULACION ANTISENTIDO DE LA EXPRESIÓN DE LA APOLIPOPROTEÍNA B
- 30 <130> P055617EP
- <150> US 60/426,234
- <151> 13-11-2002
- 35 <150> PCT/US03/015493
- <151> 15-05-2003
- <150> PCT/US03/036411
- 40 <151> 13-11-2003
- <150> EP 03789763.4
- <151> 13-11-2003
- 45 <160> 892
- <210> 1
- <211> 20
- <212> ADN
- 50 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido Antisentido
- 55 <400> 1



ES 2 417 879 T3

```

tccgtcatcg ctctcaggg          20

<210> 2
<211> 20
5 <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido
10
<400> 2

atgcattctg cccccaagga          20

15 <210> 3
   <211> 14121
   <212> ADN
   <213> Homo sapiens

20 <220>
   <221> CDS
   <222> (129)..(13820)

25 <400> 3

attcccaccg ggacctgcgg ggctgagtg ccttctcggg tgctgccgct gaggagcccg 60
cccagccagc cagggccgcg aggccgaggc caggccgcag cccaggagcc gccccaccgc 120
agctggcg atg gac ccg ccg agg ccc gcg ctg ctg gcg ctg ctg gcg ctg 170
          Met Asp Pro Pro Arg Pro Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu
          1          5          10

cct gcg ctg ctg ctg ctg ctg ctg gcg ggc gcc agg gcc gaa gag gaa 218
Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Arg Ala Glu Glu Glu
15          20          25          30

atg ctg gaa aat gtc agc ctg gtc tgt cca aaa gat gcg acc cga ttc 266
Met Leu Glu Asn Val Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Ala Thr Arg Phe
          35          40          45

```

ES 2 417 879 T3

aag cac ctc cgg aag tac aca tac aac tat gag gct gag agt tcc agt 314  
Lys His Leu Arg Lys Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu Ala Glu Ser Ser Ser  
50 55 60

gga gtc cct ggg act gct gat tca aga agt gcc acc agg atc aac tgc 362  
Gly Val Pro Gly Thr Ala Asp Ser Arg Ser Ala Thr Arg Ile Asn Cys  
65 70 75

aag gtt gag ctg gag gtt ccc cag ctc tgc agc ttc atc ctg aag acc 410  
Lys Val Glu Leu Glu Val Pro Gln Leu Cys Ser Phe Ile Leu Lys Thr  
80 85 90

agc cag tgc acc ctg aaa gag gtg tat ggc ttc aac cct gag ggc aaa 458  
Ser Gln Cys Thr Leu Lys Glu Val Tyr Gly Phe Asn Pro Glu Gly Lys  
95 100 105 110

gcc ttg ctg aag aaa acc aag aac tct gag gag ttt gct gca gcc atg 506  
Ala Leu Leu Lys Lys Thr Lys Asn Ser Glu Glu Phe Ala Ala Ala Met  
115 120 125

tcc agg tat gag ctc aag ctg gcc att cca gaa ggg aag cag gtt ttc 554  
Ser Arg Tyr Glu Leu Lys Leu Ala Ile Pro Glu Gly Lys Gln Val Phe  
130 135 140

ctt tac ccg gag aaa gat gaa cct act tac atc ctg aac atc aag agg 602  
Leu Tyr Pro Glu Lys Asp Glu Gln Thr Tyr Ile Leu Asn Ile Lys Arg  
145 150 155

ggc atc att tct gcc ctc ctg gtt ccc cca gag aca gaa gaa gcc aag 650  
Gly Ile Ile Ser Ala Leu Leu Val Pro Pro Glu Thr Thr Glu Ala Lys  
160 165 170

caa gtg ttg ttt ctg gat acc gtg tat gga aac tgc tcc act cac ttt 698  
Gln Val Leu Phe Leu Asp Thr Val Tyr Gly Asn Cys Ser Thr His Phe  
175 180 185 190

acc gtc aag acg agg aag ggc aat gtg gca aca gaa ata tcc act gaa 746  
Thr Val Lys Thr Arg Lys Gly Asn Val Ala Thr Glu Ile Ser Thr Glu  
195 200 205

aga gac ctg ggg cag tgt gat cgc ttc aag ccc atc cgc aca ggc atc 794  
Arg Asp Leu Gly Gln Cys Asp Arg Phe Lys Pro Ile Arg Thr Gly Ile  
210 215 220

agc cca ctt gct ctc atc aaa ggc atg acc cgc ccc ttg tca act ctg 842  
Ser Pro Leu Ala Leu Ile Lys Gly Met Thr Arg Pro Leu Ser Thr Leu  
225 230 235

atc agc agc agc cag tcc tgt cag tac aca ctg gac gct aag agg aag 890  
Ile Ser Ser Ser Gln Ser Cys Gln Tyr Thr Leu Asp Ala Lys Arg Lys  
240 245 250

cat gtg gca gaa gcc atc tgc aag gag caa cac ctc ttc ctg cct ttc 938  
His Val Ala Glu Ala Ile Cys Lys Glu Gln His Leu Phe Leu Pro Phe  
255 260 265 270

tcc tac aac aat aag tat ggg atg gta gca caa gtg aca cag act ttg 986  
Ser Tyr Asn Asn Lys Tyr Gly Met Val Ala Gln Val Thr Gln Thr Leu  
275 280 285

aaa ctt gaa gac aca cca aag atc aac agc cgc ttc ttt ggt gaa ggt 1034  
Lys Leu Glu Asp Thr Pro Lys Ile Asn Ser Arg Phe Phe Gly Glu Gly  
290 300

act aag aag atg ggc ctc gca ttt gag agc acc aaa tcc aca tca cct 1082  
Thr Lys Lys Met Gly Leu Ala Phe Glu Ser Thr Lys Ser Thr Ser Pro  
305 310 315

cca aag cag gcc gaa gct gtt ttg aag act ctc cag gaa ctg aaa aaa 1130

ES 2 417 879 T3

Pro	Lys	Gln	Ala	Glu	Ala	Val	Leu	Lys	Thr	Leu	Gln	Glu	Leu	Lys	Lys	
	320					325					330					
cta	acc	atc	tct	gag	caa	aat	atc	cag	aga	gct	aat	ctc	ttc	aat	aag	1178
Leu	Thr	Ile	Ser	Glu	Gln	Asn	Ile	Gln	Arg	Ala	Asn	Leu	Phe	Asn	Lys	
	335				340					345					350	
ctg	gtt	act	gag	ctg	aga	ggc	ctc	agt	gat	gaa	gca	gtc	aca	tct	ctc	1226
Leu	Val	Thr	Glu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ser	Asp	Glu	Ala	Val	Thr	Ser	Leu	
				355					360					365		
ttg	cca	cag	ctg	att	gag	gtg	tcc	agc	ccc	atc	act	tta	caa	gcc	ttg	1274
Leu	Pro	Gln	Leu	Ile	Glu	Val	Ser	Ser	Pro	Ile	Thr	Leu	Gln	Ala	Leu	
			370					375					380			
gtt	cag	tgt	gga	cag	cct	cag	tgc	tcc	act	cac	atc	ctc	cag	tgg	ctg	1322
Val	Gln	Cys	Gly	Gln	Pro	Gln	Cys	Ser	Thr	His	Ile	Leu	Gln	Trp	Leu	
	385						390					395				
aaa	cgt	gtg	cat	gcc	aac	ccc	ctt	ctg	ata	gat	gtg	gtc	acc	tac	ctg	1370
Lys	Arg	Val	His	Ala	Asn	Pro	Leu	Leu	Ile	Asp	Val	Val	Thr	Tyr	Leu	
	400					405					410					
gtg	gcc	ctg	atc	ccc	gag	ccc	tca	gca	cag	cag	ctg	cga	gag	atc	ttc	1418
Val	Ala	Leu	Ile	Pro	Glu	Pro	Ser	Ala	Gln	Gln	Leu	Arg	Glu	Ile	Phe	
	415				420					425					430	
aac	atg	gcg	agg	gat	cag	cgc	agc	cga	gcc	acc	ttg	tat	gcg	ctg	agc	1466
Asn	Met	Ala	Arg	Asp	Gln	Arg	Ser	Arg	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Leu	Ser	
				435					440					445		
cac	gcg	gtc	aac	aac	tat	cat	aag	aca	aac	cct	aca	ggg	acc	cag	gag	1514
His	Ala	Val	Asn	Asn	Tyr	His	Lys	Thr	Asn	Pro	Thr	Gly	Thr	Gln	Glu	
			450					455					460			
ctg	ctg	gac	att	gct	aat	tac	ctg	atg	gaa	cag	att	caa	gat	gac	tgc	1562
Leu	Leu	Asp	Ile	Ala	Asn	Tyr	Leu	Met	Glu	Gln	Ile	Gln	Asp	Asp	Cys	
		465					470					475				
act	ggg	gat	gaa	gat	tac	acc	tat	ttg	att	ctg	cgg	gtc	att	gga	aat	1610
Thr	Gly	Asp	Glu	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Ile	Leu	Arg	Val	Ile	Gly	Asn	
	480					485					490					
atg	ggc	caa	acc	atg	gag	cag	tta	act	cca	gaa	ctc	aag	tct	tca	atc	1658
Met	Gly	Gln	Thr	Met	Glu	Gln	Leu	Thr	Pro	Glu	Leu	Lys	Ser	Ser	Ile	
	495				500					505					510	
ctc	aaa	tgt	gtc	caa	agt	aca	aag	cca	tca	ctg	atg	atc	cag	aaa	gct	1706
Leu	Lys	Cys	Val	Gln	Ser	Thr	Lys	Pro	Ser	Leu	Met	Ile	Gln	Lys	Ala	
				515					520					525		
gcc	atc	cag	gct	ctg	cgg	aaa	atg	gag	cct	aaa	gac	aag	gac	cag	gag	1754
Ala	Ile	Gln	Ala	Leu	Arg	Lys	Met	Glu	Pro	Lys	Asp	Lys	Asp	Gln	Glu	
			530					535					540			
gtt	ctt	ctt	cag	act	ttc	ctt	gat	gat	gct	tct	ccg	gga	gat	aag	cga	1802
Val	Leu	Leu	Gln	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ala	Ser	Pro	Gly	Asp	Lys	Arg	
			545				550					555				
ctg	gct	gcc	tat	ctt	atg	ttg	atg	agg	agt	cct	tca	cag	gca	gat	att	1850
Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu	Met	Leu	Met	Arg	Ser	Pro	Ser	Gln	Ala	Asp	Ile	
	560					565					570					
aac	aaa	att	gtc	caa	att	cta	cca	tgg	gaa	cag	aat	gag	caa	gtg	aag	1898
Asn	Lys	Ile	Val	Gln	Ile	Leu	Pro	Trp	Glu	Gln	Asn	Glu	Gln	Val	Lys	
	575				580					585					590	
aac	ttt	gtg	gct	tcc	cat	att	gcc	aat	atc	ttg	aac	tca	gaa	gaa	ttg	1946
Asn	Phe	Val	Ala	Ser	His	Ile	Ala	Asn	Ile	Leu	Asn	Ser	Glu	Glu	Leu	
				595					600					605		

ES 2 417 879 T3

gat Asp	atc Ile	caa Gln 610	gat Asp 610	ctg Leu	aaa Lys	aag Lys	tta Leu	gtg Val 615	aaa Lys	gaa Glu	gct Ala	ctg Leu 620	aaa Lys 620	gaa Glu	tct Ser	1994
caa Gln	ctt Leu	cca Pro 625	act Thr	gtc Val	atg Met	gac Asp	ttc Phe 630	aga Arg	aaa Lys	ttc Phe	tct Ser 635	cgg Arg 635	aac Asn	tat Tyr	caa Gln	2042
ctc Leu	tac Tyr 640	aaa Lys	tct Ser	ggt Val	tct Ser	ctt Leu 645	cca Pro	tca Ser	ctt Leu	gac Asp 650	cca Pro 650	gcc Ala	tca Ser	gcc Ala	aaa Lys	2090
ata Ile 655	gaa Glu	ggg Gly	aat Asn	ctt Leu	ata Ile 660	ttt Phe	gat Asp	cca Pro	aat Asn	aac Asn 665	tac Tyr	ctt Leu	cct Pro	aaa Lys	gaa Glu 670	2138
agc Ser	atg Met	ctg Leu	aaa Lys	act Thr 675	acc Thr	ctc Leu	act Thr	gcc Ala	ttt Phe 680	gga Gly	ttt Phe	gct Ala	tca Ser	gct Ala 685	gac Asp	2186
ctc Leu	atc Ile	gag Glu	att Ile 690	ggc Gly	ttg Leu	gaa Glu	gga Gly	aaa Lys 695	ggc Gly	ttt Phe	gag Glu	cca Pro 700	aca Thr 700	ttg Leu	gaa Glu	2234
gct Ala	ctt Leu	ttt Phe 705	ggg Gly	aag Lys	caa Gln	gga Gly	ttt Phe 710	ttc Phe	cca Pro	gac Asp	agt Ser	gtc Val 715	aac Asn	aaa Lys	gct Ala	2282
ttg Leu	tac Tyr 720	tgg Trp	ggt Val	aat Asn	ggt Gly	caa Gln 725	gtt Val	cct Pro	gat Asp	ggt Gly	gtc Val 730	tct Ser	aag Lys	gtc Val	tta Leu	2330
gtg Val 735	gac Asp	cac His	ttt Phe	ggc Gly	tat Tyr 740	acc Thr	aaa Lys	gat Asp	gat Asp	aaa Lys 745	cat His	gag Glu	cag Gln	gat Asp	atg Met 750	2378
gta Val	aat Asn	gga Gly	ata Ile	atg Met 755	ctc Leu	agt Ser	gtt Val	gag Glu	aag Lys 760	ctg Leu	att Ile	aaa Lys	gat Asp	ttg Leu 765	aaa Lys	2426
tcc Ser	aaa Lys	gaa Glu	gtc Val 770	ccg Pro	gaa Glu	gcc Ala	aga Arg	gcc Ala 775	tac Tyr	ctc Leu	cgc Arg	atc Ile	ttg Leu 780	gga Gly	gag Glu	2474
gag Glu	ctt Leu	ggt Gly 785	ttt Phe	gcc Ala	agt Ser	ctc Leu	cat His 790	gac Asp	ctc Leu	cag Gln	ctc Leu	ctg Leu 795	gga Gly	aag Lys	ctg Leu	2522
ctt Leu 800	ctg Leu	atg Met	ggt Gly	gcc Ala	cgc Arg	act Thr 805	ctg Leu	cag Gln	ggg Gly	atc Ile	ccc Pro 810	cag Gln	atg Met	att Ile	gga Gly	2570
gag Glu 815	gtc Val	atc Ile	agg Arg	aag Lys	ggc Gly 820	tca Ser	aag Lys	aat Asn	gac Asp	ttt Phe 825	ttt Phe	ctt Leu	cac His	tac Tyr	atc Ile 830	2618
ttc Phe	atg Met	gag Glu	aat Asn	gcc Ala 835	ttt Phe	gaa Glu	ctc Leu	ccc Pro	act Thr 840	gga Gly	gct Ala	gga Gly	tta Leu	cag Gln 845	ttg Leu	2666
caa Gln	ata Ile	tct Ser	tca Ser 850	tct Ser	gga Gly	gtc Val	att Ile	gct Ala 855	ccc Pro	gga Gly	gcc Ala	aag Lys	gct Ala 860	gga Gly	gta Val	2714
aaa Lys	ctg Leu	gaa Glu 865	gta Val	gcc Ala	aac Asn	atg Met	cag Gln 870	gct Ala	gaa Glu	ctg Leu	gtg Val	gca Ala 875	aaa Lys	ccc Pro	tcc Ser	2762

ES 2 417 879 T3

gtg Val 880	tct Ser 880	gtg Val	gag Glu	ttt Phe	gtg Val 885	aca Thr 885	aat Asn	atg Met	ggc Gly	atc Ile 890	atc Ile 890	att Ile	ccg Pro	gac Asp	ttc Phe	2810
gct Ala 895	agg Arg	agt Ser	ggg Gly	gtc Val	cag Gln 900	atg Met	aac Asn	acc Thr	aac Asn	ttc Phe 905	ttc Phe	cac His	gag Glu	tcg Ser	ggt Gly 910	2858
ctg Leu	gag Glu	gct Ala	cat His	gtt Val 915	gcc Ala	cta Leu	aaa Lys	gct Ala	ggg Gly 920	aag Lys	ctg Leu	aag Lys	ttt Phe 925	atc Ile 925	att Ile	2906
cct Pro	tcc Ser	cca Pro	aag Lys 930	aga Arg	cca Pro	gtc Val	aag Lys	ctg Leu 935	ctc Leu	agt Ser	gga Gly	ggc Gly	aac Asn 940	aca Thr	tta Leu	2954
cat His	ttg Leu	gtc Val 945	tct Ser	acc Thr	acc Thr	aaa Lys 950	acg Thr 950	gag Glu	gtg Val	atc Ile	cca Pro	cct Pro 955	ctc Leu	att Ile	gag Glu	3002
aac Asn 960	agg Arg	cag Gln	tcc Ser	tgg Trp	tca Ser 965	gtt Val 965	tgc Cys	aag Lys	caa Gln	gtc Val 970	ttt Phe 970	cct Pro	ggc Gly	ctg Leu	aat Asn	3050
tac Tyr 975	tgc Cys	acc Thr	tca Ser	ggc Gly 980	gct Ala 980	tac Tyr	tcc Ser	aac Asn	gcc Ala	agc Ser 985	tcc Ser	aca Thr	gac Asp	tcc Ser	gcc Ala 990	3098
tcc Ser	tac Tyr	tat Tyr	ccg Pro	ctg Leu 995	acc Thr	ggg Gly	gac Asp	acc Thr	aga Arg 1000	tta Leu	gag Glu	ctg Leu	gaa Glu	ctg Leu 1005	agg Arg	3146
cct Pro	aca Thr	gga Gly 1010	gag Glu	att Ile	gag Glu	cag Gln	tat Tyr	tct Ser 1015	gtc Val	agc Ser	gca Ala	acc Thr	tat Tyr 1020	gag Glu	ctc Leu	3194
cag Gln 1025	aga Arg	gag Glu 1025	gac Asp	aga Arg	gcc Ala	ttg Leu 1030	gtg Val 1030	gat Asp	acc Thr	ctg Leu	aag Lys	ttt Phe 1035	gta Val	act Thr	caa Gln	3242
gca Ala 1040	gaa Glu 1040	ggt Gly	gcg Ala	aag Lys	cag Gln 1045	act Thr 1045	gag Glu	gct Ala	acc Thr	atg Met 1050	aca Thr 1050	ttc Phe	aaa Lys	tat Tyr	aat Asn	3290
cgg Arg 1055	cag Gln	agt Ser	atg Met	acc Thr	ttg Leu 1060	tcc Ser	agt Ser	gaa Glu	gtc Val	caa Gln 1065	att Ile	ccg Pro	gat Asp	ttt Phe 1070	gat Asp	3338
gtt Val	gac Asp	ctc Leu	gga Gly	aca Thr 1075	atc Ile	ctc Leu	aga Arg	gtt Val	aat Asn 1080	gat Asp	gaa Glu	tct Ser	act Thr	gag Glu 1085	ggc Gly	3386
aaa Lys	acg Thr	tct Ser	tac Tyr	aga Arg 1090	ctc Leu	acc Thr	ctg Leu	gac Asp 1095	att Ile	cag Gln	aac Asn	aag Lys	aaa Lys 1100	att Ile	act Thr	3434
gag Glu	gtc Val 1105	gcc Ala	ctc Leu	atg Met	ggc Gly	cac His 1110	cta Leu 1110	agt Ser	tgt Cys	gac Asp	aca Thr	aag Lys 1115	gaa Glu	gaa Glu	aga Arg	3482
aaa Lys 1120	atc Ile	aag Lys	ggt Gly	gtt Val	att Ile	tcc Ser 1125	ata Ile	ccc Pro	cg Arg	ttg Leu	caa Gln 1130	gca Ala	gaa Glu	gcc Ala	aga Arg	3530
agt Ser 1135	gag Glu	atc Ile	ctc Leu	gcc Ala	cac His 1140	tgg Trp	tcg Ser	cct Pro	gcc Ala	aaa Lys 1145	ctg Leu	ctt Leu	ctc Leu	caa Gln	atg Met 1150	3578

ES 2 417 879 T3

gac tca tct gct aca gct tat ggc tcc aca gtt tcc aag agg gtg gca 3626  
 Asp Ser Ser Ala Thr Ala Tyr Gly Ser Thr Val Ser Lys Arg Val Ala  
 1155 1160 1165

tgg cat tat gat gaa gag aag att gaa ttt gaa tgg aac aca ggc acc 3674  
 Trp His Tyr Asp Glu Glu Lys Ile Glu Phe Glu Trp Asn Thr Gly Thr  
 1170 1175 1180

aat gta gat acc aaa aaa atg act tcc aat ttc cct gtg gat ctc tcc 3722  
 Asn Val Asp Thr Lys Lys Met Thr Ser Asn Phe Pro Val Asp Leu Ser  
 1185 1190 1195

gat tat cct aag agc ttg cat atg tat gct aat aga ctc ctg gat cac 3770  
 Asp Tyr Pro Lys Ser Leu His Met Tyr Ala Asn Arg Leu Leu Asp His  
 1200 1205 1210

aga gtc cct gaa aca gac atg act ttc cgg cac gtg ggt tcc aaa tta 3818  
 Arg Val Pro Glu Thr Asp Met Thr Phe Arg His Val Gly Ser Lys Leu  
 1215 1220 1225 1230

ata gtt gca atg agc tca tgg ctt cag aag gca tct ggg agt ctt cct 3866  
 Ile Val Ala Met Ser Ser Trp Leu Gln Lys Ala Ser Gly Ser Leu Pro  
 1235 1240 1245

tat acc cag act ttg caa gac cac ctc aat agc ctg aag gag ttc aac 3914  
 Tyr Thr Gln Thr Leu Gln Asp His Leu Asn Ser Leu Lys Glu Phe Asn  
 1250 1255 1260

ctc cag aac atg gga ttg cca gac ttc cac atc cca gaa aac ctc ttc 3962  
 Leu Gln Asn Met Gly Leu Pro Asp Phe His Ile Pro Glu Asn Leu Phe  
 1265 1270 1275

tta aaa agc gat ggc cgg gtc aaa tat acc ttg aac aag aac agt ttg 4010  
 Leu Lys Ser Asp Gly Arg Val Lys Tyr Thr Leu Asn Lys Asn Ser Leu  
 1280 1285 1290

aaa att gag att cct ttg cct ttt ggt ggc aaa tcc tcc aga gat cta 4058  
 Lys Ile Glu Ile Pro Leu Pro Phe Gly Gly Lys Ser Ser Arg Asp Leu  
 1295 1300 1305 1310

aag atg tta gag act gtt agg aca cca gcc ctc cac ttc aag tct gtg 4106  
 Lys Met Leu Glu Thr Val Arg Thr Pro Ala Leu His Phe Lys Ser Val  
 1315 1320 1325

gga ttc cat ctg cca tct cga gag ttc caa gtc cct act ttt acc att 4154  
 Gly Phe His Leu Pro Ser Arg Glu Phe Gln Val Pro Thr Phe Thr Ile  
 1330 1335 1340

ccc aag ttg tat caa ctg caa gtg cct ctc ctg ggt gtt cta gac ctc 4202  
 Pro Lys Leu Tyr Gln Leu Gln Val Pro Leu Leu Gly Val Leu Asp Leu  
 1345 1350 1355

tcc acg aat gtc tac agc aac ttg tac aac tgg tcc gcc tcc tac agt 4250  
 Ser Thr Asn Val Tyr Ser Asn Leu Tyr Asn Trp Ser Ala Ser Tyr Ser  
 1360 1365 1370

ggt ggc aac acc agc aca gac cat ttc agc ctt cgg gct cgt tac cac 4298  
 Gly Gly Asn Thr Ser Thr Asp His Phe Ser Leu Arg Ala Arg Tyr His  
 1375 1380 1385 1390

atg aag gct gac tct gtg gtt gac ctg ctt tcc tac aat gtg caa gga 4346  
 Met Lys Ala Asp Ser Val Val Asp Leu Leu Ser Tyr Asn Val Gln Gly  
 1395 1400 1405

tct gga gaa aca aca tat gac cac aag aat acg ttc aca cta tca tgt 4394  
 Ser Gly Glu Thr Thr Tyr Asp His Lys Asn Thr Phe Thr Leu Ser Cys  
 1410 1415 1420

gat ggg tct cta cgc cac aaa ttt cta gat tcg aat atc aaa ttc agt 4442  
 Asp Gly Ser Leu Arg His Lys Phe Leu Asp Ser Asn Ile Lys Phe Ser

ES 2 417 879 T3

	1425	1430	1435	
cat	gta gaa aaa ctt gga aac aac cca gtc tca aaa ggt tta cta ata			4490
His	Val Glu Lys Leu Gly Asn Asn Pro Val Ser Lys Gly Leu Leu Ile			
	1440	1445	1450	
ttc	gat gca tct agt tcc tgg gga cca cag atg tct gct tca gtt cat			4538
Phe	Asp Ala Ser Ser Ser Trp Gly Pro Gln Met Ser Ala Ser Val His			
	1455	1460	1465	1470
ttg	gac tcc aaa aag aaa cag cat ttg ttt gtc aaa gaa gtc aag att			4586
Leu	Asp Ser Lys Lys Lys Gln His Leu Phe Val Lys Glu Val Lys Ile			
		1475	1480	1485
gat	ggg cag ttc aga gtc tct tcg ttc tat gct aaa ggc aca tat ggc			4634
Asp	Gly Gln Phe Arg Val Ser Ser Phe Tyr Ala Lys Gly Thr Tyr Gly			
		1490	1495	1500
ctg	tct tgt cag agg gat cct aac act ggc cgg ctc aat gga gag tcc			4682
Leu	Ser Cys Gln Arg Asp Pro Asn Thr Gly Arg Leu Asn Gly Glu Ser			
		1505	1510	1515
aac	ctg agg ttt aac tcc tcc tac ctc caa ggc acc aac cag ata aca			4730
Asn	Leu Arg Phe Asn Ser Ser Tyr Leu Gln Gly Thr Asn Gln Ile Thr			
		1520	1525	1530
gga	aga tat gaa gat gga acc ctc tcc ctc acc tcc acc tct gat ctg			4778
Gly	Arg Tyr Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Thr Ser Thr Ser Asp Leu			
		1535	1540	1545
caa	agt ggc atc att aaa aat act gct tcc cta aag tat gag aac tac			4826
Gln	Ser Gly Ile Ile Lys Asn Thr Ala Ser Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr			
		1555	1560	1565
gag	ctg act tta aaa tct gac acc aat ggg aag tat aag aac ttt gcc			4874
Glu	Leu Thr Leu Lys Ser Asp Thr Asn Gly Lys Tyr Lys Asn Phe Ala			
		1570	1575	1580
act	tct aac aag atg gat atg acc ttc tct aag caa aat gca ctg ctg			4922
Thr	Ser Asn Lys Met Asp Met Thr Phe Ser Lys Gln Asn Ala Leu Leu			
		1585	1590	1595
cgt	tct gaa tat cag gct gat tac gag tca ttg agg ttc ttc agc ctg			4970
Arg	Ser Glu Tyr Gln Ala Asp Tyr Glu Ser Leu Arg Phe Phe Ser Leu			
		1600	1605	1610
ctt	tct gga tca cta aat tcc cat ggt ctt gag tta aat gct gac atc			5018
Leu	Ser Gly Ser Leu Asn Ser His Gly Leu Glu Leu Asn Ala Asp Ile			
		1615	1620	1625
tta	ggc act gac aaa att aat agt ggt gct cac aag gcg aca cta agg			5066
Leu	Gly Thr Asp Lys Ile Asn Ser Gly Ala His Lys Ala Thr Leu Arg			
		1635	1640	1645
att	ggc caa gat gga ata tct acc agt gca acg acc aac ttg aag tgt			5114
Ile	Gly Gln Asp Gly Ile Ser Thr Ser Ala Thr Thr Asn Leu Lys Cys			
		1650	1655	1660
agt	ctc ctg gtg ctg gag aat gag ctg aat gca gag ctt ggc ctc tct			5162
Ser	Leu Leu Val Leu Glu Asn Glu Leu Asn Ala Glu Leu Gly Leu Ser			
		1665	1670	1675
ggg	gca tct atg aaa tta aca aca aat ggc cgc ttc agg gaa cac aat			5210
Gly	Ala Ser Met Lys Leu Thr Thr Asn Gly Arg Phe Arg Glu His Asn			
		1680	1685	1690
gca	aaa ttc agt ctg gat ggg aaa gcc gcc ctc aca gag cta tca ctg			5258
Ala	Lys Phe Ser Leu Asp Gly Lys Ala Ala Leu Thr Glu Leu Ser Leu			

ES 2 417 879 T3

1695	1700	1705	1710	
gga agt gct tat cag gcc atg att ctg ggt gtc gac agc aaa aac att 5306 Gly Ser Ala Tyr Gln Ala Met Ile Leu Gly Val Asp Ser Lys Asn Ile 1715 1720 1725				
ttc aac ttc aag gtc agt caa gaa gga ctt aag ctc tca aat gac atg 5354 Phe Asn Phe Lys Val Ser Gln Glu Gly Leu Lys Leu Ser Asn Asp Met 1730 1735 1740				
atg gcc tca tat gct gaa atg aaa ttt gac cac aca aac agt ctg aac 5402 Met Gly Ser Tyr Ala Glu Met Lys Phe Asp His Thr Asn Ser Leu Asn 1745 1750 1755				
att gca ggc tta tca ctg gac ttc tct tca aaa ctt gac aac att tac 5450 Ile Ala Gly Leu Ser Leu Asp Phe Ser Ser Lys Leu Asp Asn Ile Tyr 1760 1765 1770				
agc tct gac aag ttt tat aag caa act gtt aat tta cag cta cag ccc 5498 Ser Ser Asp Lys Phe Tyr Lys Gln Thr Val Asn Leu Gln Leu Gln Pro 1775 1780 1785 1790				
tat tct ctg gta act act tta aac agt gac ctg aaa tac aat gct ctg 5546 Tyr Ser Leu Val Thr Thr Leu Asn Ser Asp Leu Lys Tyr Asn Ala Leu 1795 1800 1805				
gat ctc acc aac aat ggg aaa cta cgg cta gaa ccc ctg aag ctg cat 5594 Asp Leu Thr Asn Asn Gly Lys Leu Arg Leu Glu Pro Leu Lys Leu His 1810 1815 1820				
gtg gct ggt aac cta aaa gga gcc tac caa aat aat gaa ata aaa cac 5642 Val Ala Gly Asn Leu Lys Gly Ala Tyr Gln Asn Asn Glu Ile Lys His 1825 1830 1835				
atc tat gcc atc tct tct gct gcc tta tca gca agc tat aaa gca gac 5690 Ile Tyr Ala Ile Ser Ser Ala Ala Leu Ser Ala Ser Tyr Lys Ala Asp 1840 1845 1850				
act gtt gct aag gtt cag ggt gtg gag ttt agc cat cgg ctc aac aca 5738 Thr Val Ala Lys Val Gln Gly Val Glu Phe Ser His Arg Leu Asn Thr 1855 1860 1865 1870				
gac atc gct ggg ctg gct tca gcc att gac atg agc aca aac tat aat 5786 Asp Ile Ala Gly Leu Ala Ser Ala Ile Asp Met Ser Thr Asn Tyr Asn 1875 1880 1885				
tca gac tca ctg cat ttc agc aat gtc ttc cgt tct gta atg gcc ccg 5834 Ser Asp Ser Leu His Phe Ser Asn Val Phe Arg Ser Val Met Ala Pro 1890 1900				
ttt acc atg acc atc gat gca cat aca aat ggc aat ggg aaa ctc gct 5882 Phe Thr Met Thr Ile Asp Ala His Thr Asn Gly Asn Gly Lys Leu Ala 1905 1910 1915				
ctc tgg gga gaa cat act ggg cag ctg tat agc aaa ttc ctg ttg aaa 5930 Leu Trp Gly Glu His Thr Gly Gln Leu Tyr Ser Lys Phe Leu Leu Lys 1920 1925 1930				
gca gaa cct ctg gca ttt act ttc tct cat gat tac aaa ggc tcc aca 5978 Ala Glu Pro Leu Ala Phe Thr Phe Ser His Asp Tyr Lys Gly Ser Thr 1935 1940 1945 1950				
agt cat cat ctc gtg tct agg aaa agc atc agt gca gct ctt gaa cac 6026 Ser His His Leu Val Ser Arg Lys Ser Ile Ser Ala Ala Leu Glu His 1955 1960 1965				
aaa gtc agt gcc ctg ctt act cca gct gag cag aca ggc acc tgg aaa 6074 Lys Val Ser Ala Leu Leu Thr Pro Ala Glu Gln Thr Gly Thr Trp Lys 1970 1975 1980				



ES 2 417 879 T3

ctc aag acc caa ttt aac aac aat gaa tac agc cag gac ttg gat gct 6122  
 Leu Lys Thr Gln Phe Asn Asn Asn Glu Tyr Ser Gln Asp Leu Asp Ala  
 1985 1990 1995

tac aac act aaa gat aaa att ggc gtg gag ctt act gga cga act ctg 6170  
 Tyr Asn Thr Lys Asp Lys Ile Gly Val Glu Leu Thr Gly Arg Thr Leu  
 2000 2005 2010

gct gac cta act cta cta gac tcc cca att aaa gtg cca ctt tta ctc 6218  
 Ala Asp Leu Thr Leu Leu Asp Ser Pro Ile Lys Val Pro Leu Leu Leu  
 2015 2020 2025 2030

agt gag ccc atc aat atc att gat gct tta gag atg aga gat gcc gtt 6266  
 Ser Glu Pro Ile Asn Ile Ile Asp Ala Leu Glu Met Arg Asp Ala Val  
 2035 2040 2045

gag aag ccc caa gaa ttt aca att gtt gct ttt gta aag tat gat aaa 6314  
 Glu Lys Pro Gln Glu Phe Thr Ile Val Ala Phe Val Lys Tyr Asp Lys  
 2050 2055 2060

aac caa gat gtt cac tcc att aac ctc cca ttt ttt gag acc ttg caa 6362  
 Asn Gln Asp Val His Ser Ile Asn Leu Pro Phe Phe Glu Thr Leu Gln  
 2065 2070 2075

gaa tat ttt gag agg aat cga caa acc att ata gtt gta gtg gaa aac 6410  
 Glu Tyr Phe Glu Arg Asn Arg Gln Thr Ile Ile Val Val Val Glu Asn  
 2080 2085 2090

gta cag aga aac ctg aag cac atc aat att gat caa ttt gta aga aaa 6458  
 Val Gln Arg Asn Leu Lys His Ile Asn Ile Asp Gln Phe Val Arg Lys  
 2095 2100 2105 2110

tac aga gca gcc ctg gga aaa ctc cca cag caa gct aat gat tat ctg 6506  
 Tyr Arg Ala Ala Leu Gly Lys Leu Pro Gln Gln Ala Asn Asp Tyr Leu  
 2115 2120 2125

aat tca ttc aat tgg gag aga caa gtt tca cat gcc aag gag aaa ctg 6554  
 Asn Ser Phe Asn Trp Glu Arg Gln Val Ser His Ala Lys Glu Lys Leu  
 2130 2135 2140

act gct ctc aca aaa aag tat aga att aca gaa aat gat ata caa att 6602  
 Thr Ala Leu Thr Lys Lys Tyr Arg Ile Thr Glu Asn Asp Ile Gln Ile  
 2145 2150 2155

gca tta gat gat gcc aaa atc aac ttt aat gaa aaa cta tct caa ctg 6650  
 Ala Leu Asp Asp Ala Lys Ile Asn Phe Asn Glu Lys Leu Ser Gln Leu  
 2160 2165 2170

cag aca tat atg ata caa ttt gat cag tat att aaa gat agt tat gat 6698  
 Gln Thr Tyr Met Ile Gln Phe Asp Gln Tyr Ile Lys Asp Ser Tyr Asp  
 2175 2180 2185 2190

tta cat gat ttg aaa ata gct att gct aat att att gat gaa atc att 6746  
 Leu His Asp Leu Lys Ile Ala Ile Ala Asn Ile Ile Asp Glu Ile Ile  
 2195 2200 2205

gaa aaa tta aaa agt ctt gat gag cac tat cat atc cgt gta aat tta 6794  
 Glu Lys Leu Lys Ser Leu Asp Glu His Tyr His Ile Arg Val Asn Leu  
 2210 2215 2220

gta aaa aca atc cat gat cta cat ttg ttt att gaa aat att gat ttt 6842  
 Val Lys Thr Ile His Asp Leu His Leu Phe Ile Glu Asn Ile Asp Phe  
 2225 2230 2235

aac aaa agt gga agt agt act gca tcc tgg att caa aat gtg gat act 6890  
 Asn Lys Ser Gly Ser Ser Thr Ala Ser Trp Ile Gln Asn Val Asp Thr  
 2240 2245 2250

aag tac caa atc aga atc cag ata caa gaa aaa ctg cag cag ctt aag 6938

ES 2 417 879 T3

Lys Tyr Gln Ile Arg Ile Gln Ile Gln Glu Lys Leu Gln Gln Leu Lys 6986  
 2255 2260 2265 2270  
 aga cac ata cag aat ata gac atc cag cac cta gct gga aag tta aaa  
 Arg His Ile Gln Asn Ile Asp Ile Gln His Leu Ala Gly Lys Leu Lys  
 2275 2280 2285

caa cac att gag gct att gat gtt aga gtg ctt tta gat caa ttg gga 7034  
 Gln His Ile Glu Ala Ile Asp Val Arg Val Leu Leu Asp Gln Leu Gly  
 2290 2295 2300

act aca att tca ttt gaa aga ata aat gat gtt ctt gag cat gtc aaa 7082  
 Thr Thr Ile Ser Phe Glu Arg Ile Asn Asp Val Leu Glu His Val Lys  
 2305 2310 2315

cac ttt gtt ata aat ctt att ggg gat ttt gaa gta gct gag aaa atc 7130  
 His Phe Val Ile Asn Leu Ile Gly Asp Phe Glu Val Ala Glu Lys Ile  
 2320 2325 2330

aat gcc ttc aga gcc aaa gtc cat gag tta atc gag agg tat gaa gta 7178  
 Asn Ala Phe Arg Ala Lys Val His Glu Leu Ile Glu Arg Tyr Glu Val  
 2335 2340 2345 2350

gac caa caa atc cag gtt tta atg gat aaa tta gta gag ttg acc cac 7226  
 Asp Gln Gln Ile Gln Val Leu Met Asp Lys Leu Val Glu Leu Thr His  
 2355 2360 2365

caa tac aag ttg aag gag act att cag aag cta agc aat gtc cta caa 7274  
 Gln Tyr Lys Leu Lys Glu Thr Ile Gln Lys Leu Ser Asn Val Leu Gln  
 2370 2375 2380

caa gtt aag ata aaa gat tac ttt gag aaa ttg gtt gga ttt att gat 7322  
 Gln Val Lys Ile Lys Asp Tyr Phe Glu Lys Leu Val Gly Phe Ile Asp  
 2385 2390 2395

gat gct gtg aag aag ctt aat gaa tta tct ttt aaa aca ttc att gaa 7370  
 Asp Ala Val Lys Lys Leu Asn Glu Leu Ser Phe Lys Thr Phe Ile Glu  
 2400 2405 2410

gat gtt aac aaa ttc ctt gac atg ttg ata aag aaa tta aag tca ttt 7418  
 Asp Val Asn Lys Phe Leu Asp Met Leu Ile Lys Lys Leu Lys Ser Phe  
 2415 2420 2425 2430

gat tac cac cag ttt gta gat gaa acc aat gac aaa atc cgt gag gtg 7466  
 Asp Tyr His Gln Phe Val Asp Glu Thr Asn Asp Lys Ile Arg Glu Val  
 2435 2440 2445

act cag aga ctc aat ggt gaa att cag gct ctg gaa cta cca caa aaa 7514  
 Thr Gln Arg Leu Asn Gly Glu Ile Gln Ala Leu Glu Leu Pro Gln Lys  
 2450 2455 2460

gct gaa gca tta aaa ctg ttt tta gag gaa acc aag gcc aca gtt gca 7562  
 Ala Glu Ala Leu Lys Leu Phe Leu Glu Glu Thr Lys Ala Thr Val Ala  
 2465 2470 2475

gtg tat ctg gaa agc cta cag gac acc aaa ata acc tta atc atc aat 7610  
 Val Tyr Leu Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Ile Thr Leu Ile Ile Asn  
 2480 2485 2490

tgg tta cag gag gct tta agt tca gca tct ttg gct cac atg aag gcc 7658  
 Trp Leu Gln Glu Ala Leu Ser Ser Ala Ser Leu Ala His Met Lys Ala  
 2495 2500 2505 2510

aaa ttc cga gag act cta gaa gat aca cga gac cga atg tat caa atg 7706  
 Lys Phe Arg Glu Thr Leu Glu Asp Thr Arg Asp Arg Met Tyr Gln Met  
 2515 2520 2525

gac att cag cag gaa ctt caa cga tac ctg tct ctg gta ggc cag gtt 7754

ES 2 417 879 T3

Asp	Ile	Gln	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Tyr	Leu	Ser	Leu	Val	Gly	Gln	Val		
			2530					2535					2540				
tat	agc	aca	ctt	gtc	acc	tac	att	tct	gat	tgg	tgg	act	ctt	gct	gct	7802	
Tyr	Ser	Thr	Leu	Val	Thr	Tyr	Ile	Ser	Asp	Trp	Trp	Thr	Leu	Ala	Ala		
		2545					2550					2555					
aag	aac	ctt	act	gac	ttt	gca	gag	caa	tat	tct	atc	caa	gat	tgg	gct	7850	
Lys	Asn	Leu	Thr	Asp	Phe	Ala	Glu	Gln	Tyr	Ser	Ile	Gln	Asp	Trp	Ala		
	2560				2565						2570						
aaa	cgt	atg	aaa	gca	ttg	gta	gag	caa	ggg	ttc	act	ggt	cct	gaa	atc	7898	
Lys	Arg	Met	Lys	Ala	Leu	Val	Glu	Gln	Gly	Phe	Thr	Val	Pro	Glu	Ile		
	2575				2580				2585						2590		
aag	acc	atc	ctt	ggg	acc	atg	cct	gcc	ttt	gaa	gtc	agt	ctt	cag	gct	7946	
Lys	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	Met	Pro	Ala	Phe	Glu	Val	Ser	Leu	Gln	Ala		
				2595					2600					2605			
ctt	cag	aaa	gct	acc	ttc	cag	aca	cct	gat	ttt	ata	gtc	ccc	cta	aca	7994	
Leu	Gln	Lys	Ala	Thr	Phe	Gln	Thr	Pro	Asp	Phe	Ile	Val	Pro	Leu	Thr		
			2610					2615					2620				
gat	ttg	agg	att	cca	tca	gtt	cag	ata	aac	ttc	aaa	gac	tta	aaa	aat	8042	
Asp	Leu	Arg	Ile	Pro	Ser	Val	Gln	Ile	Asn	Phe	Lys	Asp	Leu	Lys	Asn		
		2625				2630						2635					
ata	aaa	atc	cca	tcc	agg	ttt	tcc	aca	cca	gaa	ttt	acc	atc	ctt	aac	8090	
Ile	Lys	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Thr	Pro	Glu	Phe	Thr	Ile	Leu	Asn		
	2640				2645						2650						
acc	ttc	cac	att	cct	tcc	ttt	aca	att	gac	ttt	gtc	gaa	atg	aaa	gta	8138	
Thr	Phe	His	Ile	Pro	Ser	Phe	Thr	Ile	Asp	Phe	Val	Glu	Met	Lys	Val		
	2655				2660					2665					2670		
aag	atc	atc	aga	acc	att	gac	cag	atg	cag	aac	agt	gag	ctg	cag	tgg	8186	
Lys	Ile	Ile	Arg	Thr	Ile	Asp	Gln	Met	Gln	Asn	Ser	Glu	Leu	Gln	Trp		
				2675					2680					2685			
ccc	gtt	cca	gat	ata	tat	ctc	agg	gat	ctg	aag	gtg	gag	gac	att	cct	8234	
Pro	Val	Pro	Asp	Ile	Tyr	Leu	Arg	Asp	Leu	Lys	Val	Glu	Asp	Ile	Pro		
			2690					2695					2700				
cta	gcg	aga	atc	acc	ctg	cca	gac	ttc	cgt	tta	cca	gaa	atc	gca	att	8282	
Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Leu	Pro	Asp	Phe	Arg	Leu	Pro	Glu	Ile	Ala	Ile		
		2705					2710					2715					
cca	gaa	ttc	ata	atc	cca	act	ctc	aac	ctt	aat	gat	ttt	caa	ggt	cct	8330	
Pro	Glu	Phe	Ile	Ile	Pro	Thr	Leu	Asn	Leu	Asn	Asp	Phe	Gln	Val	Pro		
	2720					2725					2730						
gac	ctt	cac	ata	cca	gaa	ttc	cag	ctt	ccc	cac	atc	tca	cac	aca	att	8378	
Asp	Leu	His	Ile	Pro	Glu	Phe	Gln	Leu	Pro	His	Ile	Ser	His	Thr	Ile		
	2735				2740					2745					2750		
gaa	gta	cct	act	ttt	ggc	aag	cta	tac	agt	att	ctg	aaa	atc	caa	tct	8426	
Glu	Val	Pro	Thr	Phe	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ile	Gln	Ser		
				2755					2760					2765			
cct	ctt	ttc	aca	tta	gat	gca	aat	gct	gac	ata	ggg	aat	gga	acc	acc	8474	
Pro	Leu	Phe	Thr	Leu	Asp	Ala	Asn	Ala	Asp	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Thr		
			2770					2775					2780				
tca	gca	aac	gaa	gca	ggt	atc	gca	gct	tcc	atc	act	gcc	aaa	gga	gag	8522	
Ser	Ala	Asn	Glu	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Ser	Ile	Thr	Ala	Lys	Gly	Glu		
		2785					2790					2795					
tcc	aaa	tta	gaa	ggt	ctc	aat	ttt	gat	ttt	caa	gca	aat	gca	caa	ctc	8570	

ES 2 417 879 T3

Ser Lys Leu Glu Val Leu Asn Phe Asp Phe Gln Ala Asn Ala Gln Leu  
2800 2805 2810

tca aac cct aag att aat ccg ctg gct ctg aag gag tca gtg aag ttc 8618  
Ser Asn Pro Lys Ile Asn Pro Leu Ala Leu Lys Glu Ser Val Lys Phe  
2815 2820 2825 2830

tcc agc aag tac ctg aga acg gag cat ggg agt gaa atg ctg ttt ttt 8666  
Ser Ser Lys Tyr Leu Arg Thr Glu His Gly Ser Glu Met Leu Phe Phe  
2835 2840 2845

gga aat gct att gag gga aaa tca aac aca gtg gca agt tta cac aca 8714  
Gly Asn Ala Ile Glu Gly Lys Ser Asn Thr Val Ala Ser Leu His Thr  
2850 2855 2860

gaa aaa aat aca ctg gag ctt agt aat gga gtg att gtc aag ata aac 8762  
Glu Lys Asn Thr Leu Glu Leu Ser Asn Gly Val Ile Val Lys Ile Asn  
2865 2870 2875

aat cag ctt acc ctg gat agc aac act aaa tac ttc cac aaa ttg aac 8810  
Asn Gln Leu Thr Leu Asp Ser Asn Thr Lys Tyr Phe His Lys Leu Asn  
2880 2885 2890

atc ccc aaa ctg gac ttc tct agt cag gct gac ctg cgc aac gag atc 8858  
Ile Pro Lys Leu Asp Phe Ser Ser Gln Ala Asp Leu Arg Asn Glu Ile  
2895 2900 2905 2910

aag aca ctg ttg aaa gct ggc cac ata gca tgg act tct tct gga aaa 8906  
Lys Thr Leu Leu Lys Ala Gly His Ile Ala Trp Thr Ser Ser Gly Lys  
2915 2920 2925

ggg tca tgg aaa tgg gcc tgc ccc aga ttc tca gat gag gga aca cat 8954  
Gly Ser Trp Lys Trp Ala Cys Pro Arg Phe Ser Asp Glu Gly Thr His  
2930 2935 2940

gaa tca caa att agt ttc acc ata gaa gga ccc ctc act tcc ttt gga 9002  
Glu Ser Gln Ile Ser Phe Thr Ile Glu Gly Pro Leu Thr Ser Phe Gly  
2945 2950 2955

ctg tcc aat aag atc aat agc aaa cac cta aga gta aac caa aac ttg 9050  
Leu Ser Asn Lys Ile Asn Ser Lys His Leu Arg Val Asn Gln Asn Leu  
2960 2965 2970

gtt tat gaa tct ggc tcc ctc aac ttt tct aaa ctt gaa att caa tca 9098  
Val Tyr Glu Ser Gly Ser Leu Asn Phe Ser Lys Leu Glu Ile Gln Ser  
2975 2980 2985 2990

caa gtc gat tcc cag cat gtg ggc cac agt gtt cta act gct aaa ggc 9146  
Gln Val Asp Ser Gln His Val Gly His Ser Val Leu Thr Ala Lys Gly  
2995 3000 3005

atg gca ctg ttt gga gaa ggg aag gca gag ttt act ggg agg cat gat 9194  
Met Ala Leu Phe Gly Glu Gly Lys Ala Glu Phe Thr Gly Arg His Asp  
3010 3015 3020

gct cat tta aat gga aag gtt att gga act ttg aaa aat tct ctt ttc 9242  
Ala His Leu Asn Gly Lys Val Ile Gly Thr Leu Lys Asn Ser Leu Phe  
3025 3030 3035

ttt tca gcc cag cca ttt gag atc acg gca tcc aca aac aat gaa ggg 9290  
Phe Ser Ala Gln Pro Phe Glu Ile Thr Ala Ser Thr Asn Asn Glu Gly  
3040 3045 3050

aat ttg aaa gtt cgt ttt cca tta agg tta aca ggg aag ata gac ttc 9338  
Asn Leu Lys Val Arg Phe Pro Leu Arg Leu Thr Gly Lys Ile Asp Phe  
3055 3060 3065 3070

ctg aat aac tat gca ctg ttt ctg agt ccc agt gcc cag caa gca agt 9386  
Leu Asn Asn Tyr Ala Leu Phe Leu Ser Pro Ser Ala Gln Gln Ala Ser  
3075 3080 3085

ES 2 417 879 T3

tgg caa gta agt gct agg ttc aat cag tat aag tac aac caa aat ttc	9434
Trp Gln Val Ser Ala Arg Phe Asn Gln Tyr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe	
3090 3095 3100	
tct gct gga aac aac gag aac att atg gag gcc cat gta gga ata aat	9482
Ser Ala Gly Asn Asn Glu Asn Ile Met Glu Ala His Val Gly Ile Asn	
3105 3110 3115	
gga gaa gca aat ctg gat ttc tta aac att cct tta aca att cct gaa	9530
Gly Glu Ala Asn Leu Asp Phe Leu Asn Ile Pro Leu Thr Ile Pro Glu	
3120 3125 3130	
atg cgt cta cct tac aca ata atc aca act cct cca ctg aaa gat ttc	9578
Met Arg Leu Pro Tyr Thr Ile Ile Thr Thr Pro Pro Leu Lys Asp Phe	
3135 3140 3145 3150 3150	
tct cta tgg gaa aaa aca ggc ttg aag gaa ttc ttg aaa acg aca aag	9626
Ser Leu Trp Glu Lys Thr Gly Leu Lys Glu Phe Leu Lys Thr Thr Lys	
3155 3160 3165	
caa tca ttt gat tta agt gta aaa gct cag tat aag aaa aac aaa cac	9674
Gln Ser Phe Ser Ile Thr Ser Val Lys Ala Gln Tyr Lys Lys Asn Lys His	
3170 3175 3180	
agg cat tcc atc aca aat cct ttg gct gtg ctt tgt gag ttt atc agt	9722
Arg His Ser Ile Thr Asn Pro Leu Ala Val Leu Cys Glu Phe Ile Ser	
3185 3190 3195	
cag agc atc aaa tcc ttt gac agg cat ttt gaa aaa aac aga aac aat	9770
Gln Ser Ile Lys Ser Phe Asp Arg His Phe Glu Lys Asn Arg Asn Asn	
3200 3205 3210	
gca tta gat ttt gtc acc aaa tcc tat aat gaa aca aaa att aag ttt	9818
Ala Leu Asp Phe Val Thr Lys Ser Tyr Asn Glu Thr Lys Ile Lys Phe	
3215 3220 3225 3230	
gat aag tac aaa gct gaa aaa tct cac gac gag ctc ccc agg acc ttt	9866
Asp Lys Tyr Lys Ala Glu Lys Ser His Asp Glu Leu Pro Arg Thr Phe	
3235 3240 3245	
caa att cct gga tac act gtt cca gtt gtc aat gtt gaa gtg tct cca	9914
Gln Ile Pro Gly Tyr Thr Val Pro Val Val Asn Val Glu Val Ser Pro	
3250 3255 3260	
ttc acc ata gag atg tcg gca ttc ggc tat gtg ttc cca aaa gca gtc	9962
Phe Thr Ile Glu Met Ser Ala Phe Gly Tyr Val Phe Pro Lys Ala Val	
3265 3270 3275	
agc atg cct agt ttc tcc atc cta ggt tct gac gtc cgt gtg cct tca	10010
Ser Met Pro Ser Phe Ser Ile Leu Gly Ser Asp Val Arg Val Pro Ser	
3280 3285 3290	
tac aca tta atc ctg cca tca tta gag ctg cca gtc ctt cat gtc cct	10058
Tyr Thr Leu Ile Leu Pro Ser Leu Glu Leu Pro Val Leu His Val Pro	
3295 3300 3305 3310	
aga aat ctc aag ctt tct ctt cca cat ttc aag gaa ttg tgt acc ata	10106
Arg Asn Leu Lys Leu Ser Leu Pro His Phe Lys Glu Leu Cys Thr Ile	
3315 3320 3325	
agc cat att ttt att cct gcc atg ggc aat att acc tat gat ttc tcc	10154
Ser His Ile Phe Ile Pro Ala Met Gly Asn Ile Thr Tyr Asp Phe Ser	
3330 3335 3340	
ttt aaa tca agt gtc atc aca ctg aat acc aat gct gaa ctt ttt aac	10202
Phe Lys Ser Ser Val Ile Thr Leu Asn Thr Asn Ala Glu Leu Phe Asn	
3345 3350 3355	

ES 2 417 879 T3

cag tca gat att gtt gct cat ctc ctt tct tca tct tca tct gtc att 10250  
 Gln Ser Asp Ile Val Ala His Leu Leu Ser Ser Ser Ser Ser Val Ile  
 3360 3365 3370

gat gca ctg cag tac aaa tta gag ggc acc aca aga ttg aca aga aaa 10298  
 Asp Ala Leu Gln Tyr Lys Leu Glu Gly Thr Thr Arg Leu Thr Arg Lys  
 3375 3380 3385

agg gga ttg aag tta gcc aca gct ctg tct ctg agc aac aaa ttt gtg 10346  
 Arg Gly Leu Lys Leu Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn Lys Phe Val  
 3395 3400 3405

gag ggt agt cat aac agt act gtg agc tta acc acg aaa aat atg gaa 10394  
 Glu Gly Ser His Asn Ser Thr Val Ser Leu Thr Thr Lys Asn Met Glu  
 3410 3415 3420

gtg tca gtg gca aaa acc aca aaa gcc gaa att cca att ttg aga atg 10442  
 Val Ser Val Ala Lys Thr Thr Lys Ala Glu Ile Pro Ile Leu Arg Met  
 3425 3430 3435

aat ttc aag caa gaa ctt aat gga aat acc aag tca aaa cct act gtc 10490  
 Asn Phe Lys Gln Glu Leu Asn Gly Asn Thr Lys Ser Lys Pro Thr Val  
 3440 3445 3450

tct tcc tcc atg gaa ttt aag tat gat ttc aat tct tca atg ctg tac 10538  
 Ser Ser Ser Met Glu Phe Lys Tyr Asp Phe Asn Ser Ser Met Leu Tyr  
 3455 3460 3465 3470

tct acc gct aaa gga gca gtt gac cac aag ctt agc ttg gaa agc ctc 10586  
 Ser Thr Ala Lys Gly Ala Val Asp His Lys Leu Ser Leu Glu Ser Leu  
 3475 3480 3485

acc tct tac ttt tcc att gag tca tct acc aaa gga gat gtc aag ggt 10634  
 Thr Ser Tyr Phe Ser Ile Glu Ser Ser Thr Lys Gly Asp Val Lys Gly  
 3490 3495 3500

tcg gtt ctt tct cgg gaa tat tca gga act att gct agt gag gcc aac 10682  
 Ser Val Leu Ser Arg Glu Tyr Ser Gly Thr Ile Ala Ser Glu Ala Asn  
 3505 3510 3515

act tac ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag gcc 10730  
 Thr Tyr Leu Asn Ser Lys Ser Thr Arg Ser Ser Val Lys Leu Gln Gly  
 3520 3525 3530

act tcc aaa att gat gat atc tgg aac ctt gaa gta aaa gaa aat ttt 10778  
 Thr Ser Lys Ile Asp Asp Ile Trp Asn Leu Glu Val Lys Glu Asn Phe  
 3535 3540 3545 3550

gct gga gaa gcc aca ctc caa cgc ata tat tcc ctc tgg gag cac agt 10826  
 Ala Gly Glu Ala Thr Leu Gln Arg Ile Tyr Ser Leu Trp Glu His Ser  
 3555 3560 3565

acg aaa aac cac tta cag cta gag ggc ctc ttt ttc acc aac gga gaa 10874  
 Thr Lys Asn His Leu Gln Leu Glu Gly Leu Phe Phe Thr Asn Gly Glu  
 3570 3575 3580

cat aca agc aaa gcc acc ctg gaa ctc tct cca tgg caa atg tca gct 10922  
 His Thr Ser Lys Ala Thr Leu Glu Leu Ser Pro Trp Gln Met Ser Ala  
 3585 3590 3595

ctt gtt cag gtc cat gca agt cag ccc agt tcc ttc cat gat ttc cct 10970  
 Leu Val Gln Val His Ala Ser Gln Pro Ser Ser Phe His Asp Phe Pro  
 3600 3605 3610

gac ctt ggc cag gaa gtg gcc ctg aat gct aac act aag aac cag aag 11018  
 Asp Leu Gly Gln Glu Val Ala Leu Asn Ala Asn Thr Lys Asn Gln Lys  
 3615 3620 3625 3630

atc aga tgg aaa aat gaa gtc cgg att cat tct ggg tct ttc cag agc 11066

ES 2 417 879 T3

Ile	Arg	Trp	Lys	Asn	Glu	Val	Arg	Ile	His	Ser	Gly	Ser	Phe	Gln	Ser		
				3635					3640					3645			
cag	gtc	gag	ctt	tcc	aat	gac	caa	gaa	aag	gca	cac	ctt	gac	att	gca		11114
Gln	Val	Glu	Leu	Ser	Asn	Asp	Gln	Glu	Lys	Ala	His	Leu	Asp	Ile	Ala		
			3650					3655					3660				
gga	tcc	tta	gaa	gga	cac	cta	agg	ttc	ctc	aaa	aat	atc	atc	cta	cca		11162
Gly	Ser	Leu	Glu	Gly	His	Leu	Arg	Phe	Leu	Lys	Asn	Ile	Ile	Leu	Pro		
			3665				3670					3675					
gtc	tat	gac	aag	agc	tta	tgg	gat	ttc	cta	aag	ctg	gat	gta	acc	acc		11210
Val	Tyr	Asp	Lys	Ser	Leu	Trp	Asp	Phe	Leu	Lys	Leu	Asp	Val	Thr	Thr		
	3680					3685					3690						
agc	att	ggt	agg	aga	cag	cat	ctt	cgt	ggt	tca	act	gcc	ttt	gtg	tac		11258
Ser	Ile	Gly	Arg	Arg	Gln	His	Leu	Arg	Val	Ser	Thr	Ala	Phe	Val	Tyr		
	3695				3700				3705						3710		
acc	aaa	aac	ccc	aat	ggc	tat	tca	ttc	tcc	atc	cct	gta	aaa	gtt	ttg		11306
Thr	Lys	Asn	Pro	Asn	Gly	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ile	Pro	Val	Lys	Val	Leu		
				3715					3720					3725			
gct	gat	aaa	ttc	att	act	cct	ggg	ctg	aaa	cta	aat	gat	cta	aat	tca		11354
Ala	Asp	Lys	Phe	Ile	Thr	Pro	Gly	Leu	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu	Asn	Ser		
			3730					3735					3740				
ggt	ctt	gtc	atg	cct	acg	ttc	cat	gtc	cca	ttt	aca	gat	ctt	cag	ggt		11402
Val	Leu	Val	Met	Pro	Thr	Phe	His	Val	Pro	Phe	Thr	Asp	Leu	Gln	Val		
		3745					3750					3755					
cca	tcg	tgc	aaa	ctt	gac	ttc	aga	gaa	ata	caa	atc	tat	aag	aag	ctg		11450
Pro	Ser	Cys	Lys	Leu	Asp	Phe	Arg	Glu	Ile	Gln	Ile	Tyr	Lys	Lys	Leu		
	3760					3765					3770						

.....

ES 2 417 879 T3

aaa aac aaa gca gat tat gtt gaa aca gtc ctg gat tcc aca tgc agc Lys Asn Lys Ala Asp Tyr Val Glu Thr Val Leu Asp Ser Thr Cys Ser 3905 3910 3915	11882
tca acc gta cag ttc cta gaa tat gaa cta aat gtt ttg gga aca cac Ser Thr Val Gln Phe Leu Glu Tyr Glu Leu Asn Val Leu Gly Thr His 3920 3925 3930	11930
aaa atc gaa gat ggt acg tta gcc tct aag act aaa gga aca ctt gca Lys Ile Glu Asp Gly Thr Leu Ala Ser Lys Thr Lys Gly Thr Leu Ala 3935 3940 3945 3950	11978
cac cgt gac ttc agt gca gaa tat gaa gaa gat ggc aaa ttt gaa gga His Arg Asp Phe Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Lys Phe Glu Gly 3955 3960 3965	12026
ctt cag gaa tgg gaa gga aaa gcg cac ctc aat atc aaa agc cca gcg Leu Gln Glu Trp Glu Gly Lys Ala His Leu Asn Ile Lys Ser Pro Ala 3970 3975	12074
ttc acc gat ctc cat ctg cgc tac cag aaa gac aag aaa ggc atc tcc Phe Thr Asp Leu His Leu Arg Tyr Gln Lys Asp Lys Lys Gly Ile Ser 3985 3990 3995	12122
acc tca gca gcc tcc cca gcc gta ggc acc gtg ggc atg gat atg gat Thr Ser Ala Ala Ser Pro Ala Val Gly Thr Val Gly Met Asp Met Asp 4000 4005 4010	12170
gaa gat gac gac ttt tct aaa tgg aac ttc tac tac agc cct cag tcc Glu Asp Asp Asp Phe Ser Lys Trp Asn Phe Tyr Tyr Ser Pro Gln Ser 4015 4020 4025 4030	12218
tct cca gat aaa aaa ctc acc ata ttc aaa act gag ttg agg gtc cgg Ser Pro Asp Lys Lys Leu Thr Ile Phe Lys Thr Glu Leu Arg Val Arg 4035 4040 4045	12266
gaa tct gat gag gaa act cag atc aaa gtt aat tgg gaa gaa gag gca Glu Ser Asp Glu Glu Thr Gln Ile Lys Val Asn Trp Glu Glu Glu Ala 4050 4055 4060	12314
gct tct ggc ttg cta acc tct ctg aaa gac aac gtg ccc aag gcc aca Ala Ser Gly Leu Leu Thr Ser Leu Lys Asp Asn Val Pro Lys Ala Thr 4065 4070 4075	12362
ggg gtc ctt tat gat tat gtc aac aag tac cac tgg gaa cac aca ggg Gly Val Leu Tyr Asp Tyr Val Asn Lys Tyr His Trp Glu His Thr Gly 4080 4085 4090	12410
ctc acc ctg aga gaa gtg tct tca aag ctg aga aga aat ctg cag aac Leu Thr Leu Arg Glu Val Ser Ser Lys Leu Arg Arg Asn Leu Gln Asn 4095 4100 4105 4110	12458
aat gct gag tgg gtt tat caa ggg gcc att agg caa att gat gat atc Asn Ala Glu Trp Val Tyr Gln Gly Ala Ile Arg Gln Ile Asp Asp Ile 4115 4120 4125	12506
gac gtg agg ttc cag aaa gca gcc agt ggc acc act ggg acc tac caa Asp Val Arg Phe Gln Lys Ala Ala Ser Gly Thr Thr Gly Thr Tyr Gln 4130 4135 4140	12554
gag tgg aag gac aag gcc cag aat ctg tac cag gaa ctg ttg act cag Glu Trp Lys Asp Lys Ala Gln Asn Leu Tyr Gln Glu Leu Leu Thr Gln 4145 4150 4155	12602
gaa ggc caa gcc agt ttc cag gga ctc aag gat aac gtg ttt gat ggc Glu Gly Gln Ala Ser Phe Gln Gly Leu Lys Asp Asn Val Phe Asp Gly 4160 4165 4170	12650



ES 2 417 879 T3

ttg gta cga gtt act caa aaa ttc cat atg aaa gtc aag cat ctg att Leu Val Arg Val Thr Gln Lys Phe His Met Lys Val Lys His Leu Ile 4175 4180 4185 4190	12698
gac tca ctc att gat ttt ctg aac ttc ccc aga ttc cag ttt ccg ggg Asp Ser Leu Ile Asp Phe Leu Asn Phe Pro Arg Phe Gln Phe Ile Gly 4195 4200 4205	12746
aaa cct ggg ata tac act agg gag gaa ctt tgc act atg ttc ata agg Lys Pro Gly Ile Tyr Thr Arg Glu Leu Cys Thr Met Phe Ile Arg 4210 4215 4220	12794
gag gta ggg acg gta ctg tcc cag gta tat tcg aaa gtc cat aat ggt Glu Val Gly Thr Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Val His Asn Gly 4225 4230 4235	12842
tca gaa ata ctg ttt tcc tat ttc caa gac cta gtg att aca ctt cct Ser Glu Ile Leu Phe Ser Tyr Phe Gln Asp Leu Val Ile Thr Leu Pro 4240 4245 4250	12890
ttc gag tta agg aaa cat aaa cta ata gat gta atc tcg atg tat agg Phe Glu Leu Arg Lys His Lys Leu Ile Asp Val Ile Ser Met Tyr Arg 4255 4260 4265	12938
gaa ctg ttg aaa gat tta tca aaa gaa gcc caa gag gta ttt aaa gcc Glu Leu Leu Lys Asp Leu Ser Lys Glu Ala Gln Glu Val Phe Lys Ala 4275 4280 4285	12986
att cag tct ctc aag acc aca gag gtg cta cgt aat ctt cag gac ctt Ile Gln Ser Leu Lys Thr Thr Glu Val Leu Arg Asn Leu Gln Asp Leu 4290 4295 4300	13034
tta caa ttc att ttc caa cta ata gaa gat aac att aaa cag ctg aaa Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Ile Glu Asp Asn Ile Lys Gln Leu Lys 4305 4310 4315	13082
gag atg aaa ttt act tat ctt att aat tat atc caa gat gag atc aac Glu Met Lys Phe Thr Tyr Leu Ile Asn Tyr Ile Gln Asp Glu Ile Asn 4320 4325 4330	13130
aca atc ttc aat gat tat atc cca tat gtt ttt aaa ttg ttg aaa gaa Thr Ile Phe Asn Asp Tyr Ile Pro Tyr Val Phe Lys Leu Leu Lys Glu 4335 4340 4345	13178
aac cta tgc ctt aat ctt cat aag ttc aat gaa ttt att caa aac gag Asn Leu Cys Leu Asn Leu His Lys Phe Asn Glu Phe Ile Gln Asn Glu 4355 4360 4365	13226
ctt cag gaa gct tct caa gag tta cag cag atc cat caa tac att atg Leu Gln Glu Ala Ser Gln Glu Leu Gln Gln Ile His Gln Tyr Ile Met 4370 4375 4380	13274
gcc ctt cgt gaa gaa tat ttt gat cca agt ata gtt ggc tgg aca gtg Ala Leu Arg Glu Glu Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Val Gly Trp Thr Val 4385 4390 4395	13322
aaa tat tat gaa ctt gaa gaa aag ata gtc agt ctg atc aag aac ctg Lys Tyr Tyr Glu Leu Glu Glu Lys Ile Val Ser Leu Ile Lys Asn Leu 4400 4405 4410	13370
tta gtt gct ctt aag gac ttc cat tct gaa tat att gtc agt gcc tct Leu Val Ala Leu Lys Asp Phe His Ser Glu Tyr Ile Val Ser Ala Ser 4415 4420 4425 4430	13418
aac ttt act tcc caa ctc tca agt caa gtt gag caa ttt ctg cac aga Asn Phe Thr Ser Gln Leu Ser Ser Gln Val Glu Gln Phe Leu His Arg 4435 4440 4445	13466

ES 2 417 879 T3

aat att cag gaa tat ctt agc atc ctt acc gat cca gat gga aaa ggg 13514  
 Asn Ile Gln Glu Tyr Leu Ser Ile Leu Thr Asp Pro Asp Gly Lys Gly  
 4450 4455 4460

aaa gag aag att gca gag ctt tct gcc act gct cag gaa ata att aaa 13562  
 Lys Glu Lys Ile Ala Glu Leu Ser Ala Thr Ala Gln Glu Ile Ile Lys  
 4465 4470 4475

agc cag gcc att gcg acg aag aaa ata att tct gat tac cac cag cag 13610  
 Ser Gln Ala Ile Ala Thr Lys Lys Ile Ile Ser Asp Tyr His Gln Gln  
 4480 4485 4490

ttt aga tat aaa ctg caa gat ttt tca gac caa ctc tct gat tac tat 13658  
 Phe Arg Tyr Lys Leu Gln Asp Phe Ser Asp Gln Leu Ser Asp Tyr Tyr  
 4495 4500 4505 4510

gaa aaa ttt att gct gaa tcc aaa aga ttg att gac ctg tcc att caa 13706  
 Glu Lys Phe Ile Ala Glu Ser Lys Arg Leu Ile Asp Leu Ser Ile Gln  
 4515 4520 4525

aac tac cac aca ttt ctg ata tac atc acg gag tta ctg aaa aag ctg 13754  
 Asn Tyr His Thr Phe Leu Ile Tyr Ile Thr Glu Leu Leu Lys Lys Leu  
 4530 4535 4540

caa tca acc aca gtc atg aac ccc tac atg aag ctt gct cca gga gaa 13802  
 Gln Ser Thr Thr Val Met Asn Pro Tyr Met Lys Leu Ala Pro Gly Glu  
 4545 4550 4555

ctt act atc atc ctc taa ttttttaaaa gaaatcttca tttattcttc 13850  
 Leu Thr Ile Ile Leu \*  
 4560

ttttccaatt gaactttcac atagcacaga aaaaattcaa actgcctata ttgataaaac 13910

catacagtga gccagccttg cagtaggcag tagactataa gcagaagcac atatgaactg 13970

gacctgcacc aaagctggca ccagggctcg gaaggtctct gaactcagaa ggatggcatt 14030

ttttgcaagt taaagaaat caggatctga gttattttgc taaacttggg ggaggaggaa 14090

caaataaatg gagtctttat tgtgtatcat a 14121

5 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 <400> 4

tgctaaaggc acatatggcc t 21

15 <210> 5  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 <400> 5

25 ctcaggttgg actctccatt gag 23

30 <210> 6  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sonda PCR

<400> 6  
 cttgtcagag ggatcctaac actggccg 28  
 5 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 <400> 7  
 15 gaaggtgaag gtcggagtc 19  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 25 <400> 8  
 gaagatggtg atgggatttc 20  
 <210> 9  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda PCR  
 <400> 9  
 40 caagcttccc gttctcagcc 20  
 <210> 10  
 <211> 2354  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 45 <400> 10

ES 2 417 879 T3

gaattccaac ttcctcacct ctcacataca attgaaatac ctgcttttgg caaactgcat 60  
 agcatcctta agatccaatc tcctctcttt atattagatg ctaatgcaa catacagaat 120  
 gtaacaactt cagggaaaca agcagagatt gtggcttctg tcaactgctaa aggagagtcc 180  
 caatttgaag ctctcaatth tgattttcaa gcacaagctc aattcctgga gttaaatcct 240  
 catcctccag tcctgaagga atccatgaac ttctccagta agcatgtgag aatggagcat 300  
 gagggtgaga tagtatttga tggaaaggcc attgagggga aatcagacac agtcgcaagt 360  
 ttacacacag agaaaaatga agtagagttt aataatggta tgactgtcaa agtaaacaat 420  
 cagctcacc ttgacagtca cacaaagtac ttccacaagt tgagtgttcc taggctggac 480  
 ttctccagta aggcttctct taataatgaa atcaagacac tattagaagc tggacatgtg 540  
 gcattgacat cttcaggac agggcatgg aactgggctc gtcccaactt ctcggatgaa 600  
 ggcatacatt cgtcccaaat tagctttact gtggatggtc ccattgcttt tgttgacta 660  
 tccaataaca taaatggcaa acacttacgg gtcacccaaa aactgactta tgaatctggc 720  
 ttcctcaact attctaagtt tgaagttgag tcaaaaagtt aatctcagca cgtgggctcc 780  
 agcattctaa cagccaatgg tcgggcactg ctcaaggacg caaaggcaga aatgactggt 840  
 gagcacaatg ccaacttaaa tggaaaagtt attggaactt tgaaaaattc tctcttcttt 900  
 tcagcacaac catttgagat tactgcatcc acaataatg aaggaaattt gaaagtgggt 960  
 tttccactaa agctgactgg gaaaatagac ttctgaata actatgcatt gtttctgagt 1020  
 ccccggtgcc aacaagcaag ctggcaagcg agtaccagat tcaatcagta caaatacaat 1080  
 caaaactttt ctgctataaa caatgaacac aacatagaag ccagtatagg aatgaatgga 1140  
 gatgccaacc tggatttctt aaacatacct ttaacaattc ctgaaattaa cttgccttac 1200  
 acggagtca aaactccctt actgaaggat ttctccatat gggaaagaaac aggcttgaaa 1260  
 gaatttttga agacaacaaa gcaatcattt gatttgagtg taaaggctca atataaaaag 1320  
 aacagtgaca agcattccat tgttgtccct ctgggtatgt tttatgaatt tattctcaac 1380  
 aatgtcaatt cgtgggacag aaaatttgag aaagtcagaa acaatgcttt acattttctt 1440  
 accacctcct ataatgaagc aaaaattaag gttgataagt acaaaactga aaattccctt 1500  
 aatcagccct ctgggacctt tcaaaatcat ggctacacta tcccagttgt caacattgaa 1560  
 gtatctccat ttgctgtaga gacactggct tccaggcatg tgatccccac agcaataagc 1620  
 acccaagtg tcacaatccc tggtcctaac atcatggtgc cttcatacaa gttagtgtg 1680  
 ccaccctgg agttgccagt tttccatggt cctgggaatc tattcaagtt tttcctcca 1740  
 gatttcaagg gattcaacac tattgacaat atttatattc cagccatggg caactttacc 1800  
 tatgactttt cttttaaate aagtgtcatc aactgaata ccaatgctgg actttataac 1860  
 caatcagata tcggtgccca ttccttttct tcctcttcat ttgtcactga cgccctgcag 1920  
 tacaatttag agggaacatc acgtctgatg cgaaaaaggg gattgaaact agccacagct 1980  
 gtctctctaa ctaacaaatt tgtaaagggc agtcatgaca gcaccattag ttttaaccaag 2040  
 aaaaacatgg aagcatcagt gagaacaact gccaacctcc atgctcccat attctcaatg 2100  
 aacttcaagc aggaacttaa tggaaatacc aagtcaaac ccactgtttc atcatccatt 2160  
 gaactaaact atgacttcaa ttctcaaag ctgcactcta ctgcaacagg aggattgat 2220  
 cacaagttca gcttagaaa gttcacttcc tacttttcca ttgagtcatc caccaaagga 2280  
 aatatcaaga gttccttctt ttctcaggaa tattcaggaa gtgttgccaa tgaagccaat 2340  
 gtaatatctga attc 2354

<210> 11  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 <400> 11  
 10  
 cgtgggctcc agcattcta 19  
 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 20  
 <400> 12  
 agtcatttct gcctttgcgt c 21  
 25  
 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Sonda PCR  
 <400> 13  
 35  
 ccaatggtcg ggcactgctc aa 22  
 <210> 14  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 45  
 <400> 14  
 ggcaaattca acggcacagt 20  
 50  
 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
 <400> 15  
 60  
 ggtctcgct cctggaagat 20  
 <210> 16  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>

<223> Sonda PCR  
 <400> 16

5 aaggccgaga atggaagct tgcac 27  
 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 17  
 ccgcaggtcc cgtggaat 20  
 <210> 18  
 20 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 18  
 accgagaagg gcactcagcc 20  
 30 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 19  
 40 gcctcggcct cgcggcctg 20  
 <210> 20  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 50 <400> 20  
 tccatcgcca gctcgggtg 20  
 55 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 21  
 65 cagcggcagc agcggcagca 20

<210> 22  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 22  
 10 gcccgccagc agcagcagca 20  
 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 20  
 <400> 23  
 ctggaatcag cagtcccagg 20  
 25 <210> 24  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 24  
 35 cttcagcaag gctttgcct 20  
 <210> 25  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 45 <400> 25  
 ttctgttgc cacattgcc 20  
 50 <210> 26  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 26  
 60 ggaagaggtg ttgctcctg 20  
 <210> 27  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 27  
 5 tgtgctacca tcccatact 20  
  
 <210> 28  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 28  
  
 tcaaatgcca ggcccatctt 20  
 20 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 29  
 30 ggacacctca atcagctgtg 20  
  
 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 30  
  
 tcagggccac caggtagtg 20  
 45 <210> 31  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 50 <400> 31  
  
 gtaatctca tcccagtg 20  
 55 <210> 32  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 32  
 65 tgctccatgg ttggcccat 20



<210> 33  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 33  
  
 gcagccagtc gcttatctcc 20  
  
 <210> 34  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 34  
  
 gtatagccaa agtgggccac 20  
  
 25 <210> 35  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 35  
  
 35 cccaggagct ggaggtcatg 20  
  
 <210> 36  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 45 <400> 36  
  
 ttgagccctt cctgatgacc 20  
  
 50 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 37  
  
 60 atctggaccc cactcctagc 20  
  
 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 38  
 5 cagacccgac tcgtggaaga 20  
 <210> 39  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 39  
 gcctcagta gattcatcat 20  
 20 <210> 40  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 40  
 30 gccatgccac cctctggaa 20  
 <210> 41  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 41  
 aaccacgtg ccgaaagtc 20  
 <210> 42  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 42  
 50 actccagat gccttctgaa 20  
 <210> 43  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 43  
 65 atgtgtaac gagcccgaag 20

<210> 44  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 44  
  
 ggcgtagaga cccatcacat 20  
  
 <210> 45  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 45  
  
 gtgtaggat ccctcgaca 20  
  
 25 <210> 46  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 46  
  
 35 cccagtgata gctctgag 20  
  
 <210> 47  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 47  
  
 atttcagcat atgagcccat 20  
  
 50 <210> 48  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 48  
  
 60 ccctgaacct tagcaacagt 20  
  
 <210> 49  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 49  
 5 gctgaagcca gccagcgat 20  
  
 <210> 50  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 50  
  
 acagctgccc agtatgttct 20  
 20 <210> 51  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 51  
 30 cccaataaga ttataaaca 20  
  
 <210> 52  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 52  
  
 tggcctacca gagacagta 20  
 45 <210> 53  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 50 <400> 53  
  
 tcatagttt agccaatct 20  
 55 <210> 54  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 54  
 65 gcatggtccc aaggatggtc 20

<210> 55  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 55  
  
 agtgatggaa gctgcatc 20  
  
 <210> 56  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 56  
  
 atgagcatca tgctcccag 20  
  
 25 <210> 57  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 57  
  
 35 gaacacatag ccgaatgccg 20  
  
 <210> 58  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 45 <400> 58  
  
 gtggcgccct ctaattgta 20  
  
 50 <210> 59  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 59  
  
 60 cccgagaaag aaccgaacc 20  
  
 <210> 60  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 60  
 5 tgccctgcag cttcactgaa 20  
 <210> 61  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 61  
 gaaatcccat aagctctgt 20  
 20 <210> 62  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 62  
 30 agaagctgcc tcttctccc 20  
 <210> 63  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 63  
 tcagggtgag ccctgtgtgt 20  
 <210> 64  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 64  
 50 ctaatggccc ctgataaac 20  
 <210> 65  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 65  
 65 acgttatcct tgagtcctg 20

<210> 66  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 66  
  
 tataatcccag gtttcccgg 20  
  
 <210> 67  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 67  
  
 20 acctgggaca gtaccgtccc 20  
  
 <210> 68  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 68  
  
 30 ctgcctactg caaggctggc 20  
  
 <210> 69  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 69  
  
 40 agagaccttc cgagccctgg 20  
  
 <210> 70  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 70  
  
 50 atgatacaca ataaagactc 20  
  
 <210> 71  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 71  
  
 60 <210> 71  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 65 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 71

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 71  
 5 attgtatgtg agaggtgagg 20  
  
 <210> 72  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 72  
  
 gaggagattg gatcttaagg 20  
 20 <210> 73  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 73  
 30 ctcaaattg ggactctcct 20  
  
 <210> 74  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 74  
  
 tccaggaatt gagctgtgc 20  
 45 <210> 75  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 50 <400> 75  
  
 ttcaggactg gaggatgagg 20  
 55 <210> 76  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 76  
 65 tctcacctc atgctccatt 20



<210> 77  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 77  
  
 tgactgtcaa gggtagctg 20  
  
 <210> 78  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 78  
  
 gtccagccta ggaacctca 20  
 25  
 <210> 79  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 79  
 35 atgtcaatgc cacatgtcca 20  
  
 <210> 80  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 45  
 <400> 80  
  
 ttcacccgag aagttggac 20  
 50  
 <210> 81  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 81  
 60 atttgggacg aatgtatgcc 20  
  
 <210> 82  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 82 20  
 agttgaggaa gccagattca 20  
 <210> 83  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 83  
 ttcccagtca gcttagtgg 20  
 20 <210> 84  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 84  
 30 agcttgcttg ttggcacgg 20  
 <210> 85  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 85  
 cctatactgg ctctatgtt 20  
 45 <210> 86  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 86  
 55 tgaactccgt gtaaggcaag 20  
 <210> 87  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 87

gagaaatcct tcagtaagg 20  
 <210> 88  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 88  
 caatggaatg cttgtcactg 20  
 15 <210> 89  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 89  
 25 gcttcattat aggaggtgt 20  
 <210> 90  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 90  
 acaactggga tagttagcc 20  
 40 <210> 91  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 91  
 gtaggacca gggattgtga 20  
 50 <210> 92  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 92  
 60 accatggaaa actggcaact 20  
 <210> 93  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 93  
 tgggaggaaa aactgaata 20  
 <210> 94  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 94  
 20 tgggcaacga tatctgattg 20  
 <210> 95  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 95  
 30 ctgcagggcg tcagtgacaa 20  
 <210> 96  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 96  
 gcatcagacg tgatgtccc 20  
 45 <210> 97  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 97  
 55 ctgggtaaa ctaatggtgc 20  
 <210> 98  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 98

atgggagcat ggaggttggc 20  
 <210> 99  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 99  
 aatggatgat gaaacagtgg 20  
 15 <210> 100  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 100  
 25 atcaatgcct cctgttcag 20  
 <210> 101  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 101  
 ggaagtgaga ctttcaagc 20  
 40 <210> 102  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 102  
 50 aggaaggaac tcttgatatt 20  
 <210> 103  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 103  
 60 attggctca ttggcaacac 20  
 <210> 104  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 104  
 agtgaggaa gttggaattc 20  
 <210> 105  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 105  
 ttgtccctg aagttgtac 20  
 20 <210> 106  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 106  
 30 gttcatggat tcctcagga 20  
 <210> 107  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 107  
 atgctccatt ctacatgct 20  
 45 <210> 108  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 108  
 55 tgcgactg tctgattcc 20  
 <210> 109  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 109

gtccctgaag atgtcaatgc 20  
 <210> 110  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 110  
 aggccagtt ccatgaccct 20  
 15 <210> 111  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 111  
 25 ggagcccacg tgctgagatt 20  
 <210> 112  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 112  
 cgtccttgag cagtgccga 20  
 40 <210> 113  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 113  
 cccatatgga gaaatcctc 20  
 50 <210> 114  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 114  
 60 catgcctgga agccagtgtc 20  
 <210> 115  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 115  
 ggttgaaac ccttgaaac 20  
 <210> 116  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 116  
 ggtaaagtg cccatggctg 20  
 20 <210> 117  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 117  
 30 gttataaagt ccagcattgg 20  
 <210> 118  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 118  
 catcagacgt gatgttcct 20  
 45 <210> 119  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 119  
 55 tggctagttt caatcccct 20  
 <210> 120  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 120



ctgtcatgac tgccctttac 20  
 <210> 121  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 121  
 gcttgaagtt cattgagaat 20  
 15 <210> 122  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 122  
 25 ttctgagaa aggaaggaac 20  
 <210> 123  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 123  
 tcagatatac attggcttca 20  
 40 <210> 124  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 124  
 50 ttctcttcg gccctggcgc 20  
 <210> 125  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 125  
 60 ctccactgga actctcagcc 20  
 <210> 126  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 126  
 cctccagctc aaccttgag 20  
 <210> 127  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 127  
 20 gggttgaagc catacacctc 20  
 <210> 128  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 128  
 30 ccagcttgag ctcatacctg 20  
 <210> 129  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 129  
 ccctcttgat gttcaggatg 20  
 45 <210> 130  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 130  
 55 gagcagtttc catacacggt 20  
 <210> 131  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 131

cccttcctcg tcttgacggt 20  
 <210> 132  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 132  
 ttgaagcgat cacactgccc 20  
 15 <210> 133  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 133  
 25 gccttgatg agagcaagt 20  
 <210> 134  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 134  
 tcctcttagc gtccagtgt 20  
 40 <210> 135  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 135  
 cctctcagct cagtaaccag 20  
 50 <210> 136  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 136  
 60 gcactgaggc tgtcacact 20  
 <210> 137  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 137  
 cgctgatccc tcgcatgtt 20  
 <210> 138  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 138  
 gttgaccgcg tggctcagcg 20  
 20 <210> 139  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 139  
 30 gcagctcctg ggtccctgta 20  
 <210> 140  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 140  
 cccatggtag aattggaca 20  
 45 <210> 141  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 141  
 55 aatctcgatg aggtcagctg 20  
 <210> 142  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 142

gacacatca ggaactgac 20  
 <210> 143  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 143  
 gctcctctcc caagatgagg 20  
 15 <210> 144  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 144  
 25 ggcacccatc agaagcagct 20  
 <210> 145  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 145  
 agtccggaat gatgatgccc 20  
 40 <210> 146  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 146  
 ctgagcagct tgactgtct 20  
 50 <210> 147  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 147  
 60 cccggtcagc ggatagtagg 20  
 <210> 148  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 148  
 tgcacaact taggtggccc 20  
 <210> 149  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 149  
 gtctggcaat cccatgttct 20  
 20 <210> 150  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 150  
 30 cccacagact tgaagtggag 20  
 <210> 151  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 151  
 gaactgccca tcaatctga 20  
 45 <210> 152  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 152 20  
 55 cccagagagg ccaagctctg 20  
 <210> 153  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 153

5      tgtgttcct gaagcgcca                   20  
       <210> 154  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
 10      <223> Oligonucleótido Antisentido  
       <400> 154  
       accagaatc atggcctgat               20  
 15      <210> 155  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
 20      <220>  
       <223> Oligonucleótido Antisentido  
       <400> 155  
 25      ggtgcctgtc tgctcagctg           20  
       <210> 156  
       <211> 20  
       <212> ADN  
 30      <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
       <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35      <400> 156  
       atgtgaaact tgtctctccc            20  
 40      <210> 157  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
 45      <223> Oligonucleótido Antisentido  
       <400> 157  
       tatgtctgca gttgagatag            20  
 50      <210> 158  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
 55      <220>  
       <223> Oligonucleótido Antisentido  
 60      <400> 158  
       ttgaatccag gatgcagtac            20  
 65      <210> 159  
       <211> 20  
       <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 159  
 gagtctctga gtcacctcac 20  
 10 <210> 160  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 160  
 20 gatagaatat tgctctgcaa 20  
 <210> 161  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30 <400> 161  
 cccttgctct accaatgctt 20  
 <210> 162  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 162  
 40 tccattccct atgtcagcat 20  
 <210> 163  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 163  
 50 gactcctca gagccagcgg 20  
 <210> 164  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 164  
 60  
 65



cccatgctcc gttctcaggt 20  
 5 <210> 165  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 165  
 cgcaggtcag cctgactaga 20  
 15 <210> 166  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 166  
 25 cagttagaac actgtggccc 20  
 <210> 167  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 167  
 cagtgtgatg acactgatt 20  
 40 <210> 168  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 168  
 50 ctgtggctaa ctcaatccc 20  
 <210> 169  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 60 <400> 169  
 cagtactgtt atgactaccc 20  
 <210> 170  
 65 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 170  
 cactgaagac cgtgtgctct 20  
 10 <210> 171  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 171  
 20 tcgtactgtg ctcccagagg 20  
 <210> 172  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30 <400> 172  
 aagaggcct ctagctgtaa 20  
 <210> 173  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 173  
 aagaccaga atgaatccgg 20  
 <210> 174  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 50 <400> 174  
 55 gtctacctca aagcgtgcag 20  
 <210> 175  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 175

tagaggctaa cgtaccatct 20  
 <210> 176  
 5 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 176  
 ccatatccat gccacggtg 20  
 15 <210> 177  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 177  
 25 agtttctca tcagattccc 20  
 <210> 178  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 178  
 cccagtggta ctgttgaca 20  
 40 <210> 179  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 179  
 50 cccagtggtg ccactggctg 20  
 <210> 180  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 60 <400> 180  
 gtcaacagtt cctggtacag 20  
 <210> 181  
 65 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 181  
 ccctagtgtatcccaggt 20  
 10 <210> 182  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 182  
 20 ctgaagatta cgtagcacct 20  
 <210> 183  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30 <400> 183  
 gtccagccaa ctatactgg 20  
 <210> 184  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 184  
 40 cctggagcaa gcttcatgta 20  
 <210> 185  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 185  
 50 tggacagacc aggctgacat 20  
 <210> 186  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 186  
 60  
 65

atgtgtactt ccggagggtgc 20  
 5 <210> 187  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 10 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 187  
 tcttcaggat gaagctgcag 20  
 15 <210> 188  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 188  
 25 tcagcaaggc ttgccctca 20  
 <210> 189  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 189  
 ctgcttcct tctggaatgg 20  
 40 <210> 190  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 190  
 tgccacattg cccttctcg 20  
 50 <210> 191  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 191  
 60 gctgatcaga gttgacaagg 20  
 <210> 192  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 192  
 tactgacagg actggctgct 20  
 <210> 193  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 193  
 gatggcttct gccacatgct 20  
 20 <210> 194  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 194  
 30 gatgtggatt tggctctc 20  
 <210> 195  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 195  
 tgactgcttc atcactgagg 20  
 45 <210> 196  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 196  
 55 ggtagtgac cacatctatc 20  
 <210> 197  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 197

tcgcagctgc tgtgctgagg 20  
 <210> 198  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 198  
 ttccaatgac ccgcagaatc 20  
 15 <210> 199  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 199  
 25 gatcatcagt gatggcttg 20  
 <210> 200  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 200  
 agcctggatg gcagcttct 20  
 40 <210> 201  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 201  
 gtctgaagaa gaacctcctg 20  
 50 <210> 202  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 202  
 60 tatctgcctg tgaaggactc 20  
 <210> 203  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 203  
 ctgagttcaa gatattggca 20  
 <210> 204  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 204  
 20 ctccaagcc aatctcgatg 20  
 <210> 205  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 205  
 30 tgcaactgta atccagctcc 20  
 <210> 206  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 206  
 ccagttcagc ctgcatgtg 20  
 45 <210> 207  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 207  
 55 gtagagacca aatgtaatgt 20  
 <210> 208  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 208



cgttggagta agcgctgag 20  
 <210> 209  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 209  
 cagctctaat ctggtgtccc 20  
 15 <210> 210  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 210  
 25 ctgtcctctc tctggagctc 20  
 <210> 211  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 211  
 caaggtcata ctctgccgat 20  
 40 <210> 212  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 212  
 gtatggaaat aacacccttg 20  
 50 <210> 213  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 213  
 60 taagctgtag cagatgagtc 20  
 <210> 214  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 214  
 tagatctctg gaggattgc 20  
 <210> 215  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 215  
 gtctagaaca cccaggagag 20  
 20 <210> 216  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 216  
 30 accacagagt cagccttcat 20  
 <210> 217  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 217  
 aagcagacat ctgtgtccc 20  
 45 <210> 218  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 218  
 55 ctctccattg agccggccag 20  
 <210> 219  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 219

cctgatattc agaacgcagc 20  
 <210> 220  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 220  
 cagtgccata gatgtcagca 20  
 15 <210> 221  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 221  
 25 agcaccagga gactacact 20  
 <210> 222  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 222  
 cccatccaga ctgaattttg 20  
 40 <210> 223  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 223  
 50 ggttctagcc gtagttccc 20  
 <210> 224  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 224  
 60 aggttaccag ccacatgcag 20  
 <210> 225  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 225  
 atgtgcatcg atggtcatgg 20  
 <210> 226  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 226  
 20 ccagagagcg agttcccat 20  
 <210> 227  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 227  
 30 ctagacacga gatgatgact 20  
 <210> 228  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 228  
 tccaagtctt ggctgtattc 20  
 45 <210> 229  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 229  
 55 cgtccagtaa gctccagcc 20  
 <210> 230  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 230

tcaacggcat ctctcatctc 20  
 <210> 231  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 231  
 tgatagtgct catcaagact 20  
 15 <210> 232  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 232  
 25 gattctgatt tggacttag 20  
 <210> 233  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 233  
 ctctcgatta actcatggac 20  
 40 <210> 234  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 234  
 atacactgca actgtggcct 20  
 50 <210> 235  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 235  
 60 gcaagagtcc accaatcaga 20  
 <210> 236  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 236  
 agagcctgaa gactgactc 20  
 <210> 237  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 237  
 tccctcatct gagaatctgg 20  
 20 <210> 238  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 238  
 30 cagtgcacga atgacagatg 20  
 <210> 239  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 239  
 ccgaaccctt gacatctcct 20  
 45 <210> 240  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 240  
 55 gcctcactag caatagttcc 20  
 <210> 241  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 241

gacattgcc atggagagag                    20  
 <210> 242  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
    <213> Secuencia Artificial  
  
    <220>  
 10 <223> Oligonucleótido Antisentido  
    <400> 242  
  
 ctgtctccta ccaatgctgg                    20  
 15 <210> 243  
    <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
    <223> Oligonucleótido Antisentido  
    <400> 243  
 25 tctgcactga agtcacggtg                    20  
    <210> 244  
    <211> 20  
    <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
    <220>  
    <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 244  
  
 tcccgaccc tcaactcagt                    20  
 40 <210> 245  
    <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
    <223> Oligonucleótido Antisentido  
    <400> 245  
  
 gcaggtccag ttcataatgtg                    20  
 50 <210> 246  
    <211> 20  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
    <223> Oligonucleótido Antisentido  
    <400> 246  
 60 gccatccttc tgagttcaga                    20  
    <210> 247  
    <211> 20  
 65 <212> ADN  
    <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 247  
 gcctcagtct gcttcgcacc 20  
 <210> 248  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 248  
 ccccgccaggc cccggcggga 20  
 20 <210> 249  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 249  
 30 cagccccgca ggtcccggg 20  
 <210> 250  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 250  
 caaccgagaa gggcactcag 20  
 45 <210> 251  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 251  
 55 cctcagcggc agcaaccgag 20  
 <210> 252  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 252



tcctcagcgg cagcaaccga 20  
 <210> 253  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 253  
 ctctcagcg gcagcaaccg 20  
 15 <210> 254  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 254  
 25 ggctcctcag cggcagcaac 20  
 <210> 255  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 255  
 gccgggctcc tcagcggcag 20  
 40 <210> 256  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 256  
 ggtccatcgc cagctgcggt 20  
 50 <210> 257  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 257  
 60 gccgggtcca tcgccagctg 20  
 <210> 258  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 258  
 tagaggatga tagtaagttc 20  
 <210> 259  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 259  
 20 aaatgaagat ttctttaa 20  
 <210> 260  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 260  
 30 tatgtgaaag ttcaattgga 20  
 <210> 261  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 261  
 atataggcag ttgaatttt 20  
 45 <210> 262  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 262  
 55 gctcactgta tggttttatc 20  
 <210> 263  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 263

ggctcactgt atggtttat 20  
 <210> 264  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 264  
 ggctggctca ctgtatggt 20  
 15 <210> 265  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 265  
 25 aggctggctc actgtatggt 20  
 <210> 266  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 266  
 aaggctggct cactgtatgg 20  
 40 <210> 267  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 267  
 ctactgcaag gctggctcac 20  
 50 <210> 268  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 268  
 60 actgcctact gcaaggctgg 20  
 <210> 269  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 269  
 tgcttatagt ctactgccta 20  
 <210> 270  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 270  
 ttctgcttat agtctactgc 20  
 20 <210> 271  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 271  
 30 tttggtgcag gtccagttca 20  
 <210> 272  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 272  
 cagctttggt gcaggtccag 20  
 45 <210> 273  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 273  
 55 gccagctttg gtgcaggctc 20  
 <210> 274  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 274

	tggtgccagc tttggtgcag	20
	<210> 275	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 275	
	gccttggtgc cagctttggt	20
15	<210> 276	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 276	
25	gagttcagag acctccgag	20
	<210> 277	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
35	<400> 277	
	aaatgccatc cttctgagtt	20
	<210> 278	
40	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 278	
50	aaaaatgcca tcctctgag	20
	<210> 279	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
55	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 279	
60	aaaataactc agatcctgat	20
	<210> 280	
	<211> 20	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 280  
 agcaaaataa ctcagatcct 20  
 <210> 281  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 281  
 agtttagcaa aataactcag 20  
 20 <210> 282  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 282  
 30 tcccccaagt ttagcaaat 20  
 <210> 283  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 283  
 ttctctcc cccaagtta 20  
 45 <210> 284  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 284  
 55 agactccatt tattgttcc 20  
 <210> 285  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 285

5      cttctgcttg agttacaaac                   20  
       <210> 286  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
       <223> Oligonucleótido Antisentido  
       <400> 286 20  
 10  
       accttctgct tgagttacaa                   20  
 15      <210> 287  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
       <223> Oligonucleótido Antisentido  
       <400> 287 20  
 20  
 25      gcaccttctg cttgagttac                   20  
       <210> 288  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
       <223> Oligonucleótido Antisentido  
       <400> 288 20  
 30  
       tcgcaccttc tgcttgagtt                   20  
       <210> 289  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
       <223> Oligonucleótido Antisentido  
       <400> 289 20  
 35  
       cttcgcacct tctgcttgag                   20  
       <210> 290  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
       <223> Oligonucleótido Antisentido  
       <400> 290  
 40  
       tgcttcgcac cttctgcttg                   20  
       <210> 291  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
       <220>  
       <223> Oligonucleótido Antisentido  
       <400> 291  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 291  
 tctgcttcgc acctctgct 20  
 <210> 292  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 292  
 20 agtctgcttc gcacctctg 20  
 <210> 293  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 293  
 30 tcagtctgct tcgcacctc 20  
 <210> 294  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 294  
 cctcagtctg cttgcacct 20  
 45 <210> 295  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 295  
 55 agcctcagtc tgcttcgcac 20  
 <210> 296  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 296



5           gtagcctcag tctgcttcgc                   20  
             <210> 297  
             <211> 20  
             <212> ADN  
             <213> Secuencia Artificial  
  
 10           <220>  
             <223> Oligonucleótido Antisentido  
             <400> 297  
  
 15           tggtagcctc agtctgcttc                   20  
             <210> 298  
             <211> 20  
             <212> ADN  
             <213> Secuencia Artificial  
  
 20           <220>  
             <223> Oligonucleótido Antisentido  
             <400> 298  
  
 25           catgtagacc tcaagtctgct                   20  
             <210> 299  
             <211> 20  
             <212> ADN  
 30           <213> Secuencia Artificial  
             <220>  
             <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 35           <400> 299  
  
             gtcatgtagc cctcagctctg                   20  
  
 40           <210> 300  
             <211> 20  
             <212> ADN  
             <213> Secuencia Artificial  
  
 45           <220>  
             <223> Oligonucleótido Antisentido  
             <400> 300  
  
 50           atgtcatggt agcctcagtc                   20  
             <210> 301  
             <211> 20  
             <212> ADN  
             <213> Secuencia Artificial  
  
 55           <220>  
             <223> Oligonucleótido Antisentido  
             <400> 301  
  
 60           gaatgcatg gtagcctcag                   20  
             <210> 302  
             <211> 20  
 65           <212> ADN  
             <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 302  
 ttgaatgtca tggtagcctc 20  
 <210> 303  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 303  
 atttgaatgt catgtagcc 20  
 20 <210> 304  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 304  
 30 atatttgaat gtcattgtag 20  
 <210> 305  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 305  
 cagccacatg cagcttcagg 20  
 45 <210> 306  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 306  
 55 accagccaca tgcagcttca 20  
 <210> 307  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 307

ttaccagcca catgcagctt 20  
 <210> 308  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 308  
 ggttaccagc cacatgcagc 20  
 15 <210> 309  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 309  
 25 taggttacca gccacatgca 20  
 <210> 310  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 310  
 tttaggttac cagccacatg 20  
 40 <210> 311  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 311  
 cttttaggtt accagccaca 20  
 50 <210> 312  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 312  
 60 tcctttagg ttaccagcca 20  
 <210> 313  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 313  
 gctccttta ggtaccagc 20  
 <210> 314  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 314  
 20 aggctcctt taggtacca 20  
 <210> 315  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 315  
 30 gtaggctcct ttaggtac 20  
 <210> 316  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 316  
 tgtaggctc ctttaggt 20  
 45 <210> 317  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 317  
 55 tttgtaggc tcctttagg 20  
 <210> 318  
 <211> 13993  
 <212> ADN  
 60 <213> H. sapiens  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1).. (13692)  
 65 <400> 318

ES 2 417 879 T3

atg gac ccg ccg agg ccc gcg ctg ctg gcg ctg ctg gcg ctg cct gcg Met Asp Pro Pro Arg Pro Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu Pro Ala 1 5 10 15	48
ctg ctg ctg ctg ctg ctg gcg ggc gcc agg gcc gaa gag gaa atg ctg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Arg Ala Glu Glu Glu Met Leu 20 25 30	96
gaa aat gtc agc ctg gtc tgt cca aaa gat gcg acc cga ttc aag cac Glu Asn Val Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Ala Thr Arg Phe Lys His 35 40 45	144
ctc cgg aag tac aca tac aac tat gag gct gag agt tcc agt gga gtc Leu Arg Lys Tyr Thr Tyr Asn Tyr Glu Ala Glu Ser Ser Ser Gly Val 50 55 60	192
cct ggg act gct gat tca aga agt gcc acc agg atc aac tgc aag gtt Pro Gly Thr Ala Asp Ser Arg Ser Ala Thr Arg Ile Asn Cys Lys Val 65 70 75 80	240
gag ctg gag gtt ccc cag ctc tgc agc ttc atc ctg aag acc agc cag Glu Leu Glu Val Pro Gln Leu Cys Ser Phe Ile Leu Lys Thr Ser Gln 85 90 95	288
tgc acc ctg aaa gag gtg tat ggc ttc aac cct gag ggc aaa gcc ttg Cys Thr Leu Lys Glu Val Tyr Gly Phe Asn Pro Glu Gly Lys Ala Leu 100 105 110	336
ctg aag aaa acc aag aac tct gag gag ttt gct gca gcc atg tcc agg Leu Lys Lys Thr Lys Asn Ser Glu Glu Phe Ala Ala Met Ser Arg 115 120 125	384
tat gag ctc aag ctg gcc att cca gaa ggg aag cag gtt ttc ctt tac Tyr Glu Leu Lys Leu Ala Ile Pro Glu Gly Lys Gln Val Phe Leu Tyr 130 135 140	432
ccg gag aaa gat gaa cct act tac atc ctg aac atc aag agg ggc atc Pro Glu Lys Asp Glu Pro Thr Tyr Ile Leu Asn Ile Lys Arg Gly Ile 145 150 155 160	480
att tct gcc ctc ctg gtt ccc cca gag aca gaa gaa gcc aag caa gtg Ile Ser Ala Leu Leu Val Pro Pro Glu Thr Glu Glu Ala Lys Gln Val 165 170 175	528
ttg ttt ctg gat acc gtg tat gga aac tgc tcc act cac ttt acc gtc Leu Phe Leu Asp Thr Val Tyr Gly Asn Cys Ser Thr His Phe Thr Val 180 185 190	576
aag acg agg aag ggc aat gtg gca aca gaa ata tcc act gaa aga gac Lys Thr Arg Lys Gly Asn Val Ala Thr Glu Ile Ser Thr Glu Arg Asp 195 200 205	624
ctg ggg cag tgt gat cgc ttc aag ccc atc cgc aca ggc atc agc cca Leu Gly Gln Cys Asp Arg Phe Lys Pro Ile Arg Thr Gly Ile Ser Pro 210 215 220	672
ctt gct ctc atc aaa ggc atg acc cgc ccc ttg tca act ctg atc agc Leu Ala Leu Ile Lys Gly Met Thr Arg Pro Leu Ser Thr Leu Ile Ser 720	720

ES 2 417 879 T3

225	230											235				240				
agc Ser	agc Ser	cag Gln	tcc Ser	tgt Cys 245	cag Gln	tac Tyr	aca Thr	ctg Leu	gac Asp 250	gct Ala	aag Lys	agg Arg	aag Lys	cat His 255	gtg Val	768				
gca Ala	gaa Glu	gcc Ala	atc Ile 260	tgc Cys	aag Lys	gag Glu	caa Gln	cac His 265	ctc Leu	ttc Phe	ctg Leu	cct Pro	ttc Phe 270	tcc Ser	tac Tyr	816				
aag Lys	aat Asn	aag Lys 275	tat Tyr	ggg Gly	atg Met	gta Val	gca Ala 280	caa Gln	gtg Val	aca Thr	cag Gln	act Thr 285	ttg Leu	aaa Lys	ctt Leu	864				
gaa Glu	gac Asp 290	aca Thr	cca Pro	aag Lys	atc Ile	aac Asn 295	agc Ser	cgc Arg	ttc Phe	ttt Phe	ggg Gly 300	gaa Glu	ggg Gly	act Thr	aag Lys	912				
aag Lys 305	atg Met	ggc Gly	ctc Leu	gca Ala	ttt Phe 310	gag Glu	agc Ser	acc Thr	aaa Lys	tcc Ser 315	aca Thr	tca Ser	cct Pro	cca Pro	aag Lys 320	960				
cag Gln	gcc Ala	gaa Glu	gct Ala	gtt Val 325	ttg Leu	aag Lys	act Thr	ctc Leu	cag Gln 330	gaa Glu	ctg Leu	aaa Lys	aaa Lys	cta Leu 335	acc Thr	1008				
atc Ile	tct Ser	gag Glu	caa Gln 340	aat Asn	atc Ile	cag Gln	aga Arg	gct Ala 345	aat Asn	ctc Leu	ttc Phe	aat Asn	aag Lys 350	ctg Leu	gtt Val	1056				
act Thr	gag Glu	ctg Leu 355	aga Arg	ggc Gly	ctc Leu	agt Ser	gat Asp 360	gaa Glu	gca Ala	gtc Val	aca Thr	tct Ser 365	ctc Leu	ttg Leu	cca Pro	1104				
cag Gln 370	ctg Leu	att Ile	gag Glu	gtg Val	tcc Ser	agc Ser 375	ccc Pro	atc Ile	act Thr	tta Leu	caa Gln 380	gcc Ala	ttg Leu	gtt Val	cag Gln	1152				
tgt Cys 385	gga Gly	cag Gln	cct Pro	cag Gln	tgc Cys 390	tcc Ser	act Thr	cac His	atc Ile	ctc Leu 395	cag Gln	tgg Trp	ctg Leu	aaa Lys	cg Arg 400	1200				
gtg Val	cat His	gcc Ala	aac Asn	ccc Pro 405	ctt Leu	ctg Leu	ata Ile	gat Asp	gtg Val 410	gtc Val	acc Thr	tac Tyr	ctg Leu	gtg Val 415	gcc Ala	1248				
ctg Leu	atc Ile	ccc Pro 420	gag Glu	ccc Pro	tca Ser	gca Ala	cag Gln	cag Gln 425	ctg Leu	cga Arg	gag Glu	atc Ile	ttc Phe 430	aac Asn	atg Met	1296				
gcg Ala	agg Arg	gat Asp 435	cag Gln	cg Arg	agc Ser	cga Arg	gcc Ala 440	acc Thr	ttg Leu	tat Tyr	g Ala	ctg Leu	agc Ser	cac His	g Ala	1344				
gtc Val	aac Asn 450	aac Asn	tat Tyr	cat His	aag Lys	aca Thr 455	aac Asn	cct Pro	aca Thr	ggg Gly 460	acc Thr 460	cag Gln	gag Glu	ctg Leu	ctg Leu	1392				
gac Asp 465	att Ile	gct Ala	aat Asn	tac Tyr	ctg Leu 470	atg Met	gaa Glu	cag Gln	att Ile	caa Gln 475	gat Asp	gac Asp	tgc Cys	act Thr	ggg Gly 480	1440				
gat Asp	gaa Glu	gat Asp	tac Tyr	acc Thr 485	tat Tyr	ttg Leu	att Ile	ctg Leu	cgg Arg 490	gtc Val	att Ile	gga Gly	aat Asn	atg Met 495	ggc Gly	1488				
caa Gln	acc Thr	atg Met	gag Glu 500	cag Gln	tta Leu	act Thr	cca Pro	gaa Glu 505	ctc Leu	aag Lys	tct Ser	tca Ser	atc Ile 510	ctg Leu	aaa Lys	1536				

ES 2 417 879 T3

tgt gtc caa agt aca aag cca tca ctg atg atc cag aaa gct gcc atc 1584  
 Cys Val Gln Ser Thr Lys Pro Ser 520 Ile Met Ile Gln Lys 525 Ala Ala Ile  
  
 cag gct ctg cgg aaa atg gag cct aaa gac aag gac cag gag gtt ctt 1632  
 Gln Ala Leu Arg Lys Met Glu 535 Pro Lys Asp Lys Asp 540 Gln Glu Val Leu  
  
 ctt cag act ttc ctt gat gat gct tct ccg gga gat aag cga ctg gct 1680  
 Leu Gln Thr Phe Leu Asp 550 Asp Ala Ser Pro Gly 555 Asp Lys Arg Leu Ala 560  
  
 gcc tat ctt atg ttg atg agg agt cct tca cag gca gat att aac aaa 1728  
 Ala Tyr Leu Met Leu 565 Met Arg Ser Pro Ser 570 Gln Ala Asp Ile Asn Lys 575  
  
 att gtc caa att cta cca tgg gaa cag aat gag caa gtg aag aac ttt 1776  
 Ile Val Gln Ile Leu Pro Trp Glu 585 Gln Asn Glu Gln Val Lys 590 Asn Phe  
  
 gtg gct tcc cat att gcc aat atc ttg aac tca gaa gaa ttg gat atc 1824  
 Val Ala Ser His Ile Ala Asn Ile 600 Leu Asn Ser Glu Glu Leu Asp Ile  
  
 caa gat ctg aaa aag tta gtg aaa gaa gct ctg aaa gaa tct caa ctt 1872  
 Gln Asp Leu Lys Lys Leu Val 615 Lys Glu Ala Leu Lys 620 Glu Ser Gln Leu  
  
 cca act gtc atg gac ttc aga aaa ttc tct cgg aac tat caa ctc tac 1920  
 Pro Thr Val Met Asp Phe 630 Arg Lys Phe Ser Arg 635 Asn Tyr Gln Leu Tyr 640  
  
 aaa tct gtt tct ctt cca tca ctt gac cca gcc tca gcc aaa ata gaa 1968  
 Lys Ser Val Ser Leu 645 Pro Ser Leu Asp Pro Ala Ser Ala Lys Ile 655 Glu  
  
 ggg aat ctt ata ttt gat cca aat aac tac ctt cct aaa gaa agc atg 2016  
 Gly Asn Leu Ile Phe Asp Pro Asn Asn Tyr Leu Pro Lys Glu 670 Ser Met  
  
 ctg aaa act acc ctc act gcc ttt gga ttt gct tca gct gac ctc atc 2064  
 Leu Lys Thr Thr Leu Thr Ala Phe 680 Gly Phe Ala Ser Ala Asp Leu Ile 685  
  
 gag att ggc ttg gaa gga aaa ggc ttt gag cca aca ttg gag gct cct 2112  
 Glu Ile 690 Gly Leu Glu Gly Lys 695 Gly Phe Glu Pro Thr 700 Leu Glu Ala Pro  
  
 ttt ggg aag caa gga ttt ttc cca gac agt gtc aac aaa gct ttg tac 2160  
 Phe Gly Lys Gln Gly Phe 710 Phe Pro Asp Ser Val 715 Asn Lys Ala Leu Tyr 720  
  
 tgg gtt aat ggt caa gtt cct gat ggt gtc tct aag gtc tta gtg gac 2208  
 Trp Val Asn Gly Gln Val Pro Asp Gly Val 730 Ser Lys Val Leu Val Asp 735  
  
 cac ttt ggc tat acc aaa gat gat aaa cat gag cag gat atg gta aat 2256  
 His Phe Gly Tyr Thr Lys Asp Asp Lys 745 His Glu Gln Asp Met Val Asn 750  
  
 gga ata atg ctc agt gtt gag aag ctg att aaa gat ttg aaa tcc aaa 2304  
 Gly Ile Met Leu Ser Val Glu Lys 760 Leu Ile Lys Asp Leu Lys Ser Lys 765  
  
 gaa gtc ccg gaa gcc aga gcc tac ctc cgc atc ttg gga gag gag ctt 2352  
 Glu Val Pro Glu Ala Arg Ala Tyr 775 Leu Arg Ile Leu 780 Gly Glu Glu Leu 770

ES 2 417 879 T3

ggt Gly 785	ttt Phe	gcc Ala	agt Ser	ctc Leu	cat His 790	gac Asp	ctc Leu	cga Arg	ctc Leu	ctg Leu 795	gga Gly	aag Lys	ctg Leu	ctt Leu	ctg Leu 800	2400
atg Met	ggt Gly	gcc Ala	cgc Arg	act Thr 805	ctg Leu	cag Gln	ggg Gly	atc Ile	ccc Pro 810	cag Gln	atg Met	att Ile	gga Gly	gag Glu 815	gtc Val	2448
atc Ile	agg Arg	aag Lys	ggc Gly 820	tca Ser	aag Lys	aat Asn	gac Asp	ttt Phe 825	ttt Phe	ctt Leu	cac His	tac Tyr	atc Ile 830	ttc Phe	atg Met	2496
gag Glu	aat Asn	gcc Ala 835	ttt Phe	gaa Glu	ctc Leu	ccc Pro	act Thr 840	gga Gly	gct Ala	gga Gly	tta Leu	cag Gln 845	ttg Leu	caa Gln	ata Ile	2544
tct Ser 850	tca Ser	tct Ser	gga Gly	gtc Val	att Ile	gct Ala 855	ccc Pro	gga Gly	gcc Ala	aag Lys	gct Ala 860	gga Gly	gta Val	aaa Lys	ctg Leu	2592
gaa Glu 865	gta Val	gcc Ala	aac Asn	atg Met	cag Gln 870	gct Ala	gaa Glu	ctg Leu	gtg Val	gca Ala 875	aaa Lys	ccc Pro	tcc Ser	gtg Val	tct Ser 880	2640
gtg Val	gag Glu	ttt Phe	gtg Val	aca Thr 885	aat Asn	atg Met	ggc Gly	atc Ile	atc Ile 890	att Ile	ccg Pro	gac Asp	ttc Phe	gct Ala 895	agg Arg	2688
agt Ser	ggg Gly	gtc Val	cag Gln 900	atg Met	aac Asn	acc Thr	aac Asn	ttc Phe 905	ttc Phe	cac His	gag Glu	tcg Ser	ggt Gly 910	ctg Leu	gag Glu	2736
gct Ala	cat His	gtt Val 915	gcc Ala	cta Leu	aaa Lys	gct Ala	ggg Gly 920	aag Lys	ctg Leu	aag Lys	ttt Phe	atc Ile 925	att Ile	cct Pro	tcc Ser	2784
cca Pro 930	aag Lys	aga Arg	cca Pro	gtc Val	aag Lys	ctg Leu 935	ctc Leu	agt Ser	gga Gly	ggc Gly	aac Asn 940	aca Thr	tta Leu	cat His	ttg Leu	2832
gtc Val 945	tct Ser	acc Thr	acc Thr	aaa Lys	acg Thr 950	gag Glu	gtc Val	atc Ile	cca Pro	cct Pro 955	ctc Leu	att Ile	gag Glu	aac Asn	agg Arg 960	2880
cag Gln	tcc Ser	tgg Trp	tca Ser	gtt Val 965	tgc Cys	aag Lys	caa Gln	gtc Val	ttt Phe 970	cct Pro	ggc Gly	ctg Leu	aat Asn	tac Tyr 975	tgc Cys	2928
acc Thr	tca Ser	ggc Gly	gct Ala	tac Tyr	tcc Ser	aac Asn	gcc Ala	agc Ser 985	tcc Ser	aca Thr	gac Asp	tcc Ser	gcc Ala 990	tcc Ser	tac Tyr	2976
tat Tyr	ccg Pro	ctg Leu 995	acc Thr	ggg Gly	gac Asp	acc Thr	aga Arg 1000	tta Leu	gag Glu	ctg Leu	gaa Glu 1005	ctg Leu	agg Arg	cct Pro	aca Thr	3024
gga Gly 1010	gag Glu	att Ile	gag Glu	cag Gln	tat Tyr 1015	tct Ser 1015	gtc Val	agc Ser	gca Ala	acc Thr	tat Tyr 1020	gag Glu	ctc Leu	cag Gln	aga Arg	3072
gag Glu 1025	gac Asp	aga Arg	gcc Ala	ttg Leu	gtg Val 1030	gat Asp	acc Thr	ctg Leu	aag Lys	ttt Phe 1035	gta Val	act Thr	caa Gln	gca Ala	gaa Glu 1040	3120
ggc Gly	gcg Ala	aag Lys	cag Gln	act Thr 1045	gag Glu	gct Ala	acc Thr	atg Met	aca Thr 1050	ttc Phe	aaa Lys	tat Tyr	aat Asn	cgg Arg 1055	cag Gln	3168
agt Ser	atg Met	acc Thr	ttg Leu	tcc Ser	agt Ser	gaa Glu	gtc Val	caa Gln	att Ile	ccg Pro	gat Asp	ttt Phe	gat Asp	gtt Val	gac Asp	3216



ES 2 417 879 T3

1060					1065					1070						
ctc	gga	aca	atc	ctc	aga	gtt	aat	gat	gaa	tct	act	gag	ggc	aaa	acg	3264
Leu	Gly	Thr	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Asp	Glu	Ser	Thr	Glu	Gly	Lys	Thr	
		1075					1080					1085				
tct	tac	aga	ctc	acc	ctg	gac	att	cag	aac	aag	aaa	att	act	gag	gtc	3312
Ser	Tyr	Arg	Leu	Thr	Leu	Asp	Ile	Gln	Asn	Lys	Lys	Ile	Thr	Glu	Val	
	1090					1095					1100					
gcc	ctc	atg	ggc	cac	cta	agt	tgt	gac	aca	aag	gaa	gaa	aga	aaa	atc	3360
Ala	Leu	Met	Gly	His	Leu	Ser	Cys	Asp	Thr	Lys	Glu	Glu	Arg	Lys	Ile	
1105					1110					1115					1120	
aag	ggt	ggt	att	tcc	ata	ccc	cgt	ttg	caa	gca	gaa	gcc	aga	agt	gag	3408
Lys	Gly	Val	Ile	Ser	Ile	Pro	Arg	Leu	Gln	Ala	Glu	Ala	Arg	Ser	Glu	
				1125				1130						1135		
atc	ctc	gcc	cac	tgg	tcg	cct	gcc	aaa	ctg	ctt	ctc	caa	atg	gac	tca	3456
Ile	Leu	Ala	His	Trp	Ser	Pro	Ala	Lys	Leu	Leu	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	
			1140					1145					1150			
tct	gct	aca	gct	tat	ggc	tcc	aca	ggt	tcc	aag	agg	gtg	gca	tgg	cat	3504
Ser	Ala	Thr	Ala	Tyr	Gly	Ser	Thr	Val	Ser	Lys	Arg	Val	Ala	Trp	His	
		1155					1160					1165				
tat	gat	gaa	gag	aag	att	gaa	ttt	gaa	tgg	aac	aca	ggc	acc	aat	gta	3552
Tyr	Asp	Glu	Glu	Lys	Ile	Glu	Phe	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	Thr	Asn	Val	
	1170					1175					1180					
gat	acc	aaa	aaa	atg	act	tcc	aat	ttc	cct	gtg	gat	ctc	tcc	gat	tat	3600
Asp	Thr	Lys	Lys	Met	Thr	Ser	Asn	Phe	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Asp	Tyr	
1185					1190					1195					1200	
cct	aag	agc	ttg	cat	atg	tat	gct	aat	aga	ctc	ctg	gat	cac	aga	gtc	3648
Pro	Lys	Ser	Leu	His	Met	Tyr	Ala	Asn	Arg	Leu	Leu	Asp	His	Arg	Val	
				1205				1210						1215		
cct	caa	aca	gac	atg	act	ttc	cgg	cac	gtg	ggt	tcc	aaa	tta	ata	ggt	3696
Pro	Gln	Thr	Asp	Met	Thr	Phe	Arg	His	Val	Gly	Ser	Lys	Leu	Ile	Val	
			1220					1225					1230			
gca	atg	agc	tca	tgg	ctt	cag	aag	gca	tct	ggg	agt	ctt	cct	tat	acc	3744
Ala	Met	Ser	Ser	Trp	Leu	Gln	Lys	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	Pro	Tyr	Thr	
		1235					1240					1245				
cag	act	ttg	caa	gac	cac	ctc	aat	agc	ctg	aag	gag	ttc	aac	ctc	cag	3792
Gln	Thr	Leu	Gln	Asp	His	Leu	Asn	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Asn	Leu	Gln	
	1250					1255					1260					
aac	atg	gga	ttg	cca	gac	tcc	cac	atc	cca	gaa	aac	ctc	ttc	tta	aaa	3840
Asn	Met	Gly	Leu	Pro	Asp	Ser	His	Ile	Pro	Glu	Asn	Leu	Phe	Leu	Lys	
1265					1270					1275					1280	
agc	gat	ggc	cgc	gtc	aaa	tat	acc	ttg	aac	aag	aac	agt	ttg	aaa	att	3888
Ser	Asp	Gly	Arg	Val	Lys	Tyr	Thr	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Leu	Lys	Ile	
				1285				1290						1295		
gag	att	cct	ttg	cct	ttt	ggt	ggc	aaa	tcc	tcc	aga	gat	cta	aag	atg	3936
Glu	Ile	Pro	Leu	Pro	Phe	Gly	Gly	Lys	Ser	Ser	Arg	Asp	Leu	Lys	Met	
		1300						1305					1310			
tta	gag	act	ggt	agg	aca	cca	gcc	ctc	cac	ttc	aag	tct	gtg	gga	ttc	3984
Leu	Glu	Thr	Val	Arg	Thr	Pro	Ala	Leu	His	Phe	Lys	Ser	Val	Gly	Phe	
		1315					1320					1325				
cat	ctg	cca	tct	cga	gag	ttc	caa	gtc	cct	act	ttt	acc	att	ccc	aag	4032
His	Leu	Pro	Ser	Arg	Glu	Phe	Gln	Val	Pro	Thr	Phe	Thr	Ile	Pro	Lys	

ES 2 417 879 T3

1330	1335	1340	
ttg tat caa ctg caa gtg cct ctc ctg ggt gtt cta gac ctc tcc acg 4080 Leu Tyr Gln Leu Gln Val Pro Leu Leu Gly Val Leu Asp Leu Ser Thr 1360 1345 1350 1355			
aat gtc tac agc aac ttg tac aac tgg tcc gcc tcc tac agt ggt ggc 4128 Asn Val Tyr Ser Asn Leu Tyr Asn Trp Ser Ala Ser Tyr Ser Gly Gly 1375 1365 1370			
aac acc agc aca gac cat ttc agc ctt cgg gct cgt tac cac atg aag 4176 Asn Thr Ser Thr Asp His Phe Ser Leu Arg Ala Arg Tyr His Met Lys 1390 1380 1385			
gct gac tct gtg gtt gac ctg ctt tcc tac aat gtg caa gga tct gga 4224 Ala Asp Ser Val Val Asp Leu Leu Ser Tyr Asn Val Gln Gly Ser Gly 1405 1395 1400			
gaa aca aca tat gac cac aag aat acg ttc aca cta tca tgt gat ggg 4272 Glu Thr Thr Tyr Asp His Lys Asn Thr Phe Thr Leu Ser Cys Asp Gly 1420 1410 1415			
tct cta cgc cac aaa ttt cta gat tcg aat atc aaa ttc agt cat gta 4320 Ser Leu Arg His Lys Phe Leu Asp Ser Asn Ile Lys Phe Ser His Val 1440 1425 1430 1435			
gaa aaa ctt gga aac aac cca gtc tca aaa ggt tta cta ata ttc gat 4368 Glu Lys Leu Gly Asn Asn Pro Val Ser Lys Gly Leu Leu Ile Phe Asp 1455 1445 1450			
gca tct agt tcc tgg gga cca cag atg tct gct tca gtt cat ttg gac 4416 Ala Ser Ser Ser Trp Gly Pro Gln Met Ser Ala Ser Val His Leu Asp 1470 1460 1465			
tcc aaa aag aaa cag cat ttg ttt gtc aaa gaa gtc aag att gat ggg 4464 Ser Lys Lys Lys Gln His Leu Phe Val Lys Glu Val Lys Ile Asp Gly 1485 1475 1480			
cag ttc aga gtc tct tcg ttc tat gct aaa ggc aca tat ggc ctg tct 4512 Gln Phe Arg Val Ser Ser Phe Tyr Ala Lys Gly Thr Tyr Gly Leu Ser 1500 1490 1495			
tgt cag agg gat cct aac act ggc cgg ctc aat gga gag tcc aac ctg 4560 Cys Gln Arg Asp Pro Asn Thr Gly Arg Leu Asn Gly Glu Ser Asn Leu 1520 1505 1510 1515			
agg ttt aac tcc tcc tac ctc caa ggc acc aac cag ata aca gga aga 4608 Arg Phe Asn Ser Ser Tyr Leu Gln Gly Thr Asn Gln Ile Thr Gly Arg 1535 1525 1530			
tat gaa gat gga acc ctc tcc ctc acc tcc acc tct gat ctg caa agt 4656 Tyr Glu Asp Gly Thr Leu Ser Leu Thr Ser Thr Ser Asp Leu Gln Ser 1550 1540 1545			
ggc atc att aaa aat act gct tcc cta aag tat gag aac tac gag ctg 4704 Gly Ile Ile Lys Asn Thr Ala Ser Leu Lys Tyr Glu Asn Tyr Glu Leu 1565 1555 1560			
act tta aaa tct gac acc aat ggg aag tat aag aac ttt gcc act tct 4752 Thr Leu Lys Ser Asp Thr Asn Gly Lys Tyr Lys Asn Phe Ala Thr Ser 1580 1570 1575			
aac aag atg gat atg acc ttc tct aag caa aat gca ctg ctg cgt tct 4800 Asn Lys Met Asp Met Thr Phe Ser Lys Gln Asn Ala Leu Leu Arg Ser 1600 1585 1590 1595			
gaa tat cag gct gat tac gag tca ttg agg ttc ttc agc ctg ctt tct 4848 Glu Tyr Gln Ala Asp Tyr Glu Ser Leu Arg Phe Phe Ser Leu Leu Ser			



ES 2 417 879 T3

tca ctg cat ttc agc aat gtc ttc cgt tct gta atg gcc ccg ttt acc 5712  
 Ser Leu His Phe Ser Asn Val Phe Arg Ser Val Met Ala Pro Phe Thr  
 1890 1895 1900

atg acc atc gat gca cat aca aat ggc aat ggg aaa ctc gct ctc tgg 5760  
 Met Thr Ile Asp Ala His Thr Asn Gly Asn Gly Lys Leu Ala Leu Trp  
 1905 1910 1915 1920

gga gaa cat act ggg cag ctg tat agc aaa ttc ctg ttg aaa gca gaa 5808  
 Gly Glu His Thr Gly Gln Leu Tyr Ser Lys Phe Leu Leu Lys Ala Glu  
 1925 1930 1935

cct ctg gca ttt act ttc tct cat gat tac aaa ggc tcc aca agt cat 5856  
 Pro Leu Ala Phe Thr Phe Ser His Asp Tyr Lys Gly Ser Thr Ser His  
 1940 1945 1950

cat ctc gtg tct agg aaa agc atc agt gca gct ctt gaa cac aaa gtc 5904  
 His Leu Val Ser Arg Lys Ser Ile Ser Ala Ala Leu Glu His Lys Val  
 1955 1960 1965

agt gcc ctg ctt act cca gct gag cag aca ggc acc tgg aaa ctc aag 5952  
 Ser Ala Leu Leu Thr Pro Ala Glu Gln Thr Gly Thr Trp Lys Leu Lys  
 1970 1975 1980

acc caa ttt aac aac aat gaa tac agc cag gac ttg gat gct tac aac 6000  
 Thr Gln Phe Asn Asn Asn Glu Tyr Ser Gln Asp Leu Asp Ala Tyr Asn  
 1985 1990 1995 2000

act aaa gat aaa att ggc gtg gag ctt act gga cga act ctg gct gac 6048  
 Thr Lys Asp Lys Ile Gly Val Glu Leu Thr Gly Arg Thr Leu Ala Asp  
 2005 2010 2015

cta act cta cta gac tcc cca att aaa gtg cca ctt tta ctc agt gag 6096  
 Leu Thr Leu Leu Asp Ser Pro Ile Lys Val Pro Leu Leu Leu Ser Glu  
 2020 2025 2030

ccc atc aat atc aat gat gct tta gag atg aga gat gcc gtt gag aag 6144  
 Pro Ile Asn Ile Asn Asp Ala Leu Glu Met Arg Asp Ala Val Glu Lys  
 2035 2040 2045

ccc caa gaa ttt aca att gtt gct ttt gta aag tat gat aaa aac caa 6192  
 Pro Gln Glu Phe Thr Ile Val Ala Phe Val Lys Tyr Asp Lys Asn Gln  
 2050 2055 2060

gat gtt cac tcc att aac ctc cca ttt ttt gag acc ttg caa gaa tat 6240  
 Asp Val His Ser Ile Asn Leu Pro Phe Phe Glu Thr Leu Gln Glu Tyr  
 2065 2070 2075 2080

ttt gag agg aat cga caa acc att ata gtt gta ctg gaa aac gta cag 6288  
 Phe Glu Arg Asn Arg Gln Thr Ile Ile Val Val Leu Glu Asn Val Gln  
 2085 2090 2095

aga aac ctg aag cac atc aat att gat caa ttt gta aga aaa tac aga 6336  
 Arg Asn Leu Lys His Ile Asn Ile Asp Gln Phe Val Arg Lys Tyr Arg  
 2100 2105 2110

gca gcc ctg gga aaa ctc cca cag caa gct aat gat tat ctg aat tca 6384  
 Ala Ala Leu Gly Lys Leu Pro Gln Gln Ala Asn Asp Tyr Leu Asn Ser  
 2115 2120 2125

ttc aat tgg gag aga caa gtt tca cat gcc aag gag aaa ctg act gct 6432  
 Phe Asn Trp Glu Arg Gln Val Ser His Ala Lys Glu Lys Leu Thr Ala  
 2130 2135 2140

ctc aca aaa aag tat aga att aca gaa aat gat ata caa att gca tta 6480  
 Leu Thr Lys Lys Tyr Arg Ile Thr Glu Asn Asp Ile Gln Ile Ala Leu  
 2145 2150 2155 2160

ES 2 417 879 T3

gat gat gcc aaa atc aac ttt aat gaa aaa cta tct caa ctg cag aca 6528  
 Asp Asp Ala Lys Ile Asn Phe Asn Glu Lys Leu Ser Gln Leu Gln Thr  
 2165 2170 2175

tat atg ata caa ttt gat cag tat att aaa gat agt tat gat tta cat 6576  
 Tyr Met Ile Gln Phe Asp Gln Tyr Ile Lys Asp Ser Tyr Asp Leu His  
 2180 2185 2190

gat ttg aaa ata gct att gct aat att att gat gaa atc att gaa aaa 6624  
 Asp Leu Lys Ile Ala Ile Ala Asn Ile Ile Asp Glu Ile Ile Glu Lys  
 2195 2200 2205

tta aaa agt ctt gat gag cac tat cat acc cgt gta aat tta gta aaa 6672  
 Leu Lys Ser Leu Asp Glu His Tyr Cat His Thr Arg Val Asn Leu Val Lys  
 2210 2215 2220

aca atc cat gat cta cat ttg ttt att gaa aat att gat ttt aac aaa 6720  
 Thr Ile His Asp Leu His Leu Phe Ile Glu Asn Ile Asp Phe Asn Lys  
 2225 2230 2235 2240

agt gga agt agt act gca tcc tgg att caa aat gtg gat act aag tac 6768  
 Ser Gly Ser Ser Thr Ala Ser Trp Ile Gln Asn Val Asp Thr Lys Tyr  
 2245 2250 2255

caa atc aga atc cag ata caa gaa aaa ctg cag cag ctt aag aga cac 6816  
 Gln Ile Arg Ile Gln Ile Gln Glu Lys Leu Gln Gln Leu Lys Arg His  
 2260 2265 2270

ata cag aat ata gac atc cag cac cta gct gga aag tta aaa caa cac 6864  
 Ile Gln Asn Ile Asp Ile Gln His Leu Ala Gly Lys Leu Lys Gln His  
 2275 2280 2285

att gag gct att gat gtt aga gtg ctt tta gat caa ttg gga act aca 6912  
 Ile Glu Ala Ile Asp Val Arg Val Leu Leu Asp Gln Leu Gly Thr Thr  
 2290 2295 2300

att tca ttt gaa aga ata aat gat gtt ctt gag cat gtc aaa cac ttt 6960  
 Ile Ser Phe Glu Arg Ile Asn Asp Val Leu Glu His Val Lys His Phe  
 2305 2310 2315 2320

gtt ata aat ctt att ggg gat ttt gaa gta gct gag aaa atc aat gcc 7008  
 Val Ile Asn Leu Ile Gly Asp Phe Glu Val Ala Glu Lys Ile Asn Ala  
 2325 2330 2335

ttc aga gcc aaa gtc cat gag tta atc gag agg tat gaa gta gac caa 7056  
 Phe Arg Ala Lys Val His Glu Leu Ile Glu Arg Tyr Glu Val Asp Gln  
 2340 2345 2350

caa atc cag gtt tta atg gat aaa tta gta gag ttg gcc cac caa tac 7104  
 Gln Ile Gln Val Leu Met Asp Lys Leu Val Glu Leu Ala His Gln Tyr  
 2355 2360 2365

aag ttg aag gag act att cag aag cta agc aat gtc cta caa caa gtt 7152  
 Lys Leu Lys Glu Thr Ile Gln Lys Leu Ser Asn Val Leu Gln Gln Val  
 2370 2375 2380

aag ata aaa gat tac ttt gag aaa ttg gtt gga ttt att gat gat gct 7200  
 Lys Ile Lys Asp Tyr Phe Glu Lys Leu Val Gly Phe Ile Asp Asp Ala  
 2385 2390 2395 2400

gtc aag aag ctt aat gaa tta tct ttt aaa aca ttc att gaa gat gtt 7248  
 Val Lys Lys Leu Asn Glu Leu Ser Phe Lys Thr Phe Ile Glu Asp Val  
 2405 2410 2415

aac aaa ttc ctt gac atg ttg ata aag aaa tta aag tca ttt gat tac 7296  
 Asn Lys Phe Leu Asp Met Leu Ile Lys Lys Leu Lys Ser Phe Asp Tyr  
 2420 2425 2430

cac cag ttt gta gat gaa acc aat gac aaa atc cgt gag gtg act cag 7344  
 His Gln Phe Val Asp Glu Thr Asn Asp Lys Ile Arg Glu Val Thr Gln



ES 2 417 879 T3

2705	2710	2715	2720	
ttc ata atc cca act ctc aac ctt aat gat ttt caa gtt cct gac ctt Phe Ile Ile Pro Thr Leu Asn Leu Asn Asp Phe Gln Val Pro Asp Leu 2725 2730 2735				8208
cac ata cca gaa ttc cag ctt ccc cac atc tca cac aca att gaa gta His Ile Pro Glu Phe Gln Leu Pro His Ile Ser His Thr Ile Glu Val 2740 2745 2750				8256
cct act ttt ggc aag cta tac agt att ctg aaa atc caa tct cct ctt Pro Thr Phe Gly Lys Leu Tyr Ser Ile Leu Lys Ile Gln Ser Pro Leu 2755 2760 2765				8304
ttc aca tta gat gca aat gct gac ata ggg aat gga acc acc tca gca Phe Thr Leu Asp Ala Asn Ala Asp Ile Gly Asn Gly Thr Thr Ser Ala 2770 2775 2780				8352
aac gaa gca ggt atc gca gct tcc atc act gcc aaa gga gag tcc aaa Asn Glu Ala Gly Ile Ala Ala Ser Ile Thr Ala Lys Gly Glu Ser Lys 2785 2790 2795 2800				8400
tta gaa gtt ctc aat ttt gat ttt caa gca aat gca caa ctc tca aac Leu Glu Val Leu Asn Phe Asp Phe Gln Ala Asn Ala Gln Leu Ser Asn 2805 2810 2815				8448
cct aag att aat ccg ctg gct ctg aag gag tca gtg aag ttc tcc agc Pro Lys Ile Asn Pro Leu Ala Leu Lys Glu Ser Val Lys Phe Ser Ser 2820 2825 2830				8496
aag tac ctg aga acg gag cat ggg agt gaa atg ctg ttt ttt gga aat Lys Tyr Leu Arg Thr Glu His Gly Ser Glu Met Leu Phe Phe Gly Asn 2835 2840 2845				8544
gct att gag gga aaa tca aac aca gtg gca agt tta cac aca gaa aaa Ala Ile Glu Gly Lys Ser Asn Thr Val Ala Ser Leu His Thr Glu Lys 2850 2855 2860				8592
aat aca ctg gag ctt agt aat gga gtg att gtc aag ata aac aat cag Asn Thr Leu Glu Leu Ser Asn Gly Val Ile Val Lys Ile Asn Asn Gln 2865 2870 2875 2880				8640
ctt acc ctg gat agc aac act aaa tac ttc cac aaa ttg aac atc ccc Leu Thr Leu Asp Ser Asn Thr Lys Tyr Phe His Lys Leu Asn Ile Pro 2885 2890 2895				8688
aaa ctg gac ttc tct agt cag gct gac ctg cgc aac gag atc aag aca Lys Leu Asp Phe Ser Ser Gln Ala Asp Leu Arg Asn Glu Ile Lys Thr 2900 2905 2910				8736
ctg ttg aaa gct ggc cac ata gca tgg act tct tct gga aaa ggg tca Leu Leu Lys Ala Gly His Ile Ala Trp Thr Ser Ser Gly Lys Gly Ser 2915 2920 2925				8784
tgg aaa tgg gcc tcg ccc aga ttc tca gat gag gga aca cat gaa tca Trp Lys Trp Ala Ser Pro Arg Phe Ser Asp Glu Gly Thr His Glu Ser 2930 2935 2940				8832
caa att agt ttc acc ata gaa gga ccc ctc act tcc ttt gga ctg tcc Gln Ile Ser Phe Thr Ile Glu Gly Pro Leu Thr Ser Phe Gly Leu Ser 2945 2950 2955 2960				8880
aat aag atc aat agc aaa cac cta aga gta aac caa aac ttg gtt tat Asn Lys Ile Asn Ser Lys His Leu Arg Val Asn Gln Asn Leu Val Tyr 2965 2970 2975				8928
gaa tct ggc tcc ctc aac ttt tct aaa ctt gaa att caa tca caa gtc Glu Ser Gly Ser Leu Asn Phe Ser Lys Leu Glu Ile Gln Ser Gln Val 2980 2985 2990				8976





ES 2 417 879 T3

ata gag atg tcg gca ttc ggc tat gtg ttc cca aaa gca gtc agc atg Ile Glu Met Ser Ala Phe Gly Tyr Val Phe Pro Lys Ala Val Ser Met 3265 3270 3275 3280	9840
cct agt ttc tcc atc ata ggt tct gac gtc cgt gtg cct tca tac aca Pro Ser Phe Ser Ile Ile Gly Ser Asp Val Arg Val Pro Ser Tyr Thr 3285 3290 3295	9888
tta atc ctg cca tca tta gag ctg cca gtc ctt cat gtc cct aga aat Leu Ile Leu Pro Ser Leu Glu Leu Val Leu His Val Pro Arg Asn 3300 3305 3310	9936
ctc aag ctt tct ctt cca gat ttc aag gaa ttg tgt acc ata agc cat Leu Lys Leu Ser Leu Pro Asp Phe Lys Glu Leu Cys Thr Ile Ser His 3315 3320 3325	9984
att ttt att cct gcc atg ggc aat att acc tat gat ttc tcc ttt aaa Ile Phe Ile Pro Ala Met Gly Asn Ile Thr Tyr Asp Phe Ser Phe Lys 3330 3335 3340	10032
tca agt gtc atc aca ctg aat acc aat gct gaa ctt ttt aac cag tca Ser Ser Val Ile Thr Leu Asn Thr Asn Ala Glu Leu Phe Asn Gln Ser 3345 3350 3355 3360	10080
gat att gtt gct cat ctc ctt tct tca tct tca tct gtc att gat gca Asp Ile Val Ala His Leu Leu Ser Ser Ser Ser Val Ile Asp Ala 3365 3370 3375	10128
ctg cag tac aaa tta gag ggc acc aca aga ttg aca aga aaa agg gga Leu Gln Tyr Lys Leu Glu Gly Thr Arg Leu Thr Arg Lys Arg Gly 3380 3385 3390	10176
ttg aag tta gcc aca gct ctg tct ctg agc aac aaa ttt gtg gag ggt Leu Lys Leu Ala Thr Ala Leu Ser Leu Ser Asn Lys Phe Val Glu Gly 3395 3400 3405	10224
agt cat aac agt act gtg agc tta acc acg aaa aat atg gaa gtg tca Ser His Asn Ser Thr Val Ser Leu Thr Thr Lys Asn Met Glu Val Ser 3410 3415 3420	10272
gtg gca aaa acc aca aaa ccg gaa att cca att ttg aga atg aat ttc Val Ala Lys Thr Thr Lys Pro Glu Ile Pro Ile Leu Arg Met Asn Phe 3425 3430 3435 3440	10320
aag caa gaa ctt aat gga aat acc aag tca aaa cct act gtc tct tcc Lys Gln Glu Leu Asn Gly Asn Thr Lys Ser Lys Pro Thr Val Ser Ser 3445 3450 3455	10368
tcc atg gaa ttt aag tat gat ttc aat tct tca atg ctg tac tct acc Ser Met Glu Phe Lys Tyr Asp Phe Asn Ser Ser Met Leu Tyr Ser Thr 3460 3465 3470	10416
gct aaa gga gca gtt gac cac aag ctt agc ttg gaa agc ctc acc tct Ala Lys Gly Ala Val Asp His Lys Leu Ser Leu Glu Ser Leu Thr Ser 3475 3480 3485	10464
tac ttt tcc att gag tca tct acc aaa gga gat gtc aag ggt tcg gtt Tyr Phe Ser Ile Glu Ser Ser Thr Lys Gly Asp Val Lys Gly Ser Val 3490 3495 3500	10512
ctt tct cgg gaa tat tca gga act att gct agt gag gcc aac act tac Leu Ser Arg Glu Tyr Ser Gly Thr Ile Ala Ser Glu Ala Asn Thr Tyr 3505 3510 3515 3520	10560
ttg aat tcc aag agc aca cgg tct tca gtg aag ctg cag ggc act tcc Leu Asn Ser Lys Ser Thr Arg Ser Ser Val Lys Leu Gln Gly Thr Ser 3525 3530 3535	10608

ES 2 417 879 T3

aaa att gat gat atc tgg aac ctt gaa gta aaa gaa aat ttt gct gga 10656  
 Lys Ile Asp Asp Ile Trp Asn Leu Glu Val Lys Glu Asn Phe Ala Gly  
 3540 3545 3550

gaa gcc aca ctc caa cgc ata tat tcc ctc tgg gag cac agt acg aaa 10704  
 Glu Ala Thr Leu Gln Arg Ile Tyr Ser Leu Trp Glu His Ser Thr Lys  
 3555 3560 3565

aac cac tta cag cta gag ggc ctc ttt ttc acc aac gga gaa cat aca 10752  
 Asn His Leu Gln Leu Glu Gly Leu Phe Phe Thr Asn Gly Glu His Thr  
 3570 3575 3580

agc aaa gcc acc ctg gaa ctc tct cca tgg caa atg tca gct ctt gtt 10800  
 Ser Lys Ala Thr Leu Glu Leu Ser Pro Trp Gln Met Ser Ala Leu Val  
 3585 3590 3600

cag gtc cat gca agt cag ccc agt tcc ttc cat gat ttc cct gac ctt 10848  
 Gln Val His Ala Ser Gln Pro Ser Ser Phe His Asp Phe Pro Asp Leu  
 3605 3610 3615

ggc cag gaa gtg gcc ctg aat gct aac act aag aac cag aag atc aga 10896  
 Gly Gln Glu Val Ala Leu Asn Ala Asn Thr Lys Asn Gln Lys Ile Arg  
 3620 3625 3630

tgg aaa aat gaa gtc cgg att cat tct ggg tct ttc cag agc cag gtc 10944  
 Trp Lys Asn Glu Val Arg Ile His Ser Gly Ser Phe Gln Ser Gln Val  
 3635 3640 3645

gag ctt tcc aat gac caa gaa aag gca cac ctt gac att gca gga tcc 10992  
 Glu Leu Ser Asn Asp Gln Glu Lys Ala His Leu Asp Ile Ala Gly Ser  
 3650 3655 3660

tta gaa gga cac cta agg ttc ctc aaa aat atc atc cta cca gtc tat 11040  
 Leu Glu Gly His Leu Arg Phe Leu Lys Asn Ile Ile Leu Pro Val Tyr  
 3665 3670 3680

gac aag agc tta tgg gat ttc cta aag ctg gat gtc acc acc agc att 11088  
 Asp Lys Ser Leu Trp Asp Phe Leu Lys Leu Asp Val Thr Thr Ser Ile  
 3685 3690 3695

ggt agg aga cag cat ctt cgt gtt tca act gcc ttt gtg tac acc aaa 11136  
 Gly Arg Arg Gln His Leu Arg Val Ser Thr Ala Phe Val Tyr Thr Lys  
 3700 3705 3710

aac ccc aat ggc tat tca ttc tcc atc cct gta aaa gtt ttg gct gat 11184  
 Asn Pro Asn Gly Tyr Ser Phe Ser Ile Pro Val Lys Val Leu Ala Asp  
 3715 3720 3725

aaa ttc att att cct ggg ctg aaa cta aat gat cta aat tca gtt ctt 11232  
 Lys Phe Ile Ile Pro Gly Leu Lys Leu Asn Asp Leu Asn Ser Val Leu  
 3730 3735 3740

gtc atg cct acg ttc cat gtc cca ttt aca gat ctt cag gtt cca tcg 11280  
 Val Met Pro Thr Phe His Val Pro Phe Thr Asp Leu Gln Val Pro Ser  
 3745 3750 3755 3760

tgc aaa ctt gac ttc aga gaa ata caa atc tat aag aag ctg aga act 11328  
 Cys Lys Leu Asp Phe Arg Glu Ile Gln Ile Tyr Lys Lys Leu Arg Thr  
 3765 3770 3775

tca tca ttt gcc ctc acc cta cca aca ctc ccc gag gta aaa ttc cct 11376  
 Ser Ser Phe Ala Leu Thr Leu Pro Thr Leu Pro Glu Val Lys Phe Pro  
 3780 3785 3790

gaa gtt gat gtg tta aca aaa tat tct caa cca gaa gac tcc ttg att 11424  
 Glu Val Asp Val Leu Thr Lys Tyr Ser Gln Pro Glu Asp Ser Leu Ile  
 3795 3800 3805

ES 2 417 879 T3

ccc ttt ttt gag ata acc gtg cct gaa tct cag tta act gtg tcc cag 11472  
 Pro Phe Phe Glu Ile Thr Val Pro Glu Ser Gln Leu Thr Val Ser Gln  
 3810 3815 3820

ttc acg ctt cca aaa agt gtt tca gat ggc att gct gct ttg gat cta 11520  
 Phe Thr Leu Pro Lys Ser Val Ser Asp Gly Ile Ala Ala Leu Asp Leu  
 3825 3830 3835 3840

aat gca gta gcc aac aag atc gca gac ttt gag ttg ccc acc atc atc 11568  
 Asn Ala Val Ala Asn Lys Ile Ala Asp Phe Glu Leu Pro Thr Ile Ile  
 3845 3850 3855

gtg cct gag cag acc att gag att ccc tcc att aag ttc tct gta cct 11616  
 Val Pro Glu Gln Thr Ile Glu Ile Pro Ser Ile Lys Phe Ser Val Pro  
 3860 3865 3870

gct gga att gtc att cct tcc ttt caa gca ctg act gca cgc ttt gag 11664  
 Ala Gly Ile Val Ile Pro Ser Phe Gln Ala Leu Thr Ala Arg Phe Glu  
 3875 3880 3885

gta gac tct ccc gtg tat aat gcc act tgg agt gcc agt ttg aaa aac 11712  
 Val Asp Ser Pro Val Tyr Asn Ala Thr Trp Ser Ala Ser Leu Lys Asn  
 3890 3900

aaa gca gat tat gtt gaa aca gtc ctg gat tcc aca tgc agc tca acc 11760  
 Lys Ala Asp Tyr Val Gln Thr Val Leu Asp Ser Thr Cys Ser Ser Thr  
 3905 3910 3915 3920

gta cag ttc cta gaa tat gaa cta aat gtt ttg gga aca cac aaa atc 11808  
 Val Gln Phe Leu Glu Tyr Glu Leu Asn Val Leu Gly Thr His Lys Ile  
 3925 3930 3935

gaa gat ggt acg tta gcc tct aag act aaa gga aca ctt gca cac cgt 11856  
 Glu Asp Gly Thr Leu Ala Ser Lys Thr Lys Gly Thr Leu Ala His Arg  
 3940 3945 3950

gac ttc agt gca gaa tat gaa gaa gat ggc aaa tat gaa gga ctt cag 11904  
 Asp Phe Ser Ala Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Lys Tyr Glu Gly Leu Gln  
 3955 3960 3965

gaa tgg gaa gga aaa gcg cac ctc aat atc aaa agc cca gcg ttc acc 11952  
 Glu Trp Glu Gly Lys Ala His Leu Asn Ile Lys Ser Pro Ala Phe Thr  
 3970 3975 3980

gat ctc cat ctg cgc tac cag aaa gac aag aaa ggc atc tcc acc tca 12000  
 Asp Leu His Leu Arg Tyr Gln Lys Asp Lys Lys Gly Ile Ser Thr Ser  
 3985 3990 3995 4000

gca gcc tcc cca gcc gta ggc acc gtg ggc atg gat atg gat gaa gat 12048  
 Ala Ala Ser Pro Ala Val Gly Thr Val Gly Met Asp Met Asp Glu Asp  
 4005 4010 4015

gac gac ttt tct aaa tgg aac ttc tac tac agc cct cag tcc tct cca 12096  
 Asp Asp Phe Ser Lys Trp Asn Phe Tyr Tyr Ser Pro Gln Ser Ser Pro  
 4020 4025 4030

gat aaa aaa ctc acc ata ttc aaa act gag ttg agg gtc cgg gaa tct 12144  
 Asp Lys Lys Leu Thr Ile Phe Lys Thr Glu Leu Arg Val Arg Glu Ser  
 4035 4040 4045

gat gag gaa act cag atc aaa gtt aat tgg gaa gaa gag gca gct tct 12192  
 Asp Glu Glu Thr Gln Ile Lys Val Asn Trp Glu Glu Glu Ala Ala Ser  
 4050 4055 4060

ggc ttg cta acc tct ctg aaa gac aac gtg ccc aag gcc aca ggg gtc 12240  
 Gly Leu Leu Thr Ser Leu Lys Asp Asn Val Pro Lys Ala Thr Gly Val  
 4065 4070 4075 4080

ctt tat gat tat gtc aac aag tac cac tgg gaa cac aca ggg ctc acc 12288  
 Leu Tyr Asp Tyr Val Asn Lys Tyr His Trp Glu His Thr Gly Leu Thr

ES 2 417 879 T3

4085										4090					4095					
ctg	aga	gaa	gtg	tct	tca	aag	ctg	aga	aga	aat	ctg	cag	aac	aat	gct	12336				
Leu	Arg	Glu	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Arg	Arg	Asn	Leu	Gln	Asn	Asn	Ala					
			4100					4105					4110							
gag	tgg	gtt	tat	caa	ggg	gcc	att	agg	caa	att	gat	gat	atc	gac	gtg	12384				
Glu	Trp	Val	Tyr	Gln	Gly	Ala	Ile	Arg	Gln	Ile	Asp	Asp	Ile	Asp	Val					
		4115					4120					4125								
agg	ttc	cag	aaa	gca	gcc	agt	ggc	acc	act	ggg	acc	tac	caa	gag	tgg	12432				
Arg	Phe	Gln	Lys	Ala	Ala	Ser	Gly	Thr	Thr	Gly	Thr	Tyr	Gln	Glu	Trp					
	4130					4135					4140									
aag	gac	aag	gcc	cag	aat	ctg	tac	cag	gaa	ctg	ttg	act	cag	gaa	ggc	12480				
Lys	Asp	Lys	Ala	Gln	Asn	Leu	Tyr	Gln	Glu	Leu	Leu	Thr	Gln	Glu	Gly					
4145					4150					4155					4160					
caa	gcc	agt	ttc	cag	gga	ctc	aag	gat	aac	gtg	ttt	gat	ggc	ttg	gta	12528				
Gln	Ala	Ser	Phe	Gln	Gly	Leu	Lys	Asp	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Leu	Val					
				4165					4170					4175						
cga	gtt	act	caa	aaa	ttc	cat	atg	aaa	gtc	aag	aag	ctg	att	gac	tca	12576				
Arg	Val	Thr	Gln	Lys	Phe	His	Met	Lys	Val	Lys	Lys	Leu	Ile	Asp	Ser					
			4180					4185					4190							
ctc	att	gat	ttt	ctg	aac	ttc	ccc	aga	ttc	cag	ttt	ccg	ggg	aaa	cct	12624				
Leu	Ile	Asp	Phe	Leu	Asn	Phe	Pro	Arg	Phe	Gln	Phe	Pro	Gly	Lys	Pro					
		4195					4200					4205								
ggg	ata	tac	act	agg	gag	gaa	ctt	tgc	act	atg	ttc	atg	agg	gag	gta	12672				
Gly	Ile	Tyr	Thr	Arg	Glu	Glu	Leu	Cys	Thr	Met	Phe	Met	Arg	Glu	Val					
	4210					4215					4220									
ggg	acg	gta	ctg	tcc	cag	gta	tat	tcg	aaa	gtc	cat	aat	ggt	tca	gaa	12720				
Gly	Thr	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Tyr	Ser	Lys	Val	His	Asn	Gly	Ser	Glu					
4225					4230					4235					4240					
ata	ctg	ttt	tcc	tat	ttc	caa	gac	cta	gtg	att	aca	ctt	cct	ttc	gag	12768				
Ile	Leu	Phe	Ser	Tyr	Phe	Gln	Asp	Leu	Val	Ile	Thr	Leu	Pro	Phe	Glu					
				4245					4250					4255						
tta	agg	aaa	cat	aaa	cta	ata	gat	gta	atc	tcg	atg	tat	agg	gaa	ctg	12816				
Leu	Arg	Lys	His	Lys	Leu	Ile	Asp	Val	Ile	Ser	Met	Tyr	Arg	Glu	Leu					
			4260				4265						4270							
ttg	aaa	gat	tta	tca	aaa	gaa	gcc	caa	gag	gta	ttt	aaa	gcc	att	cag	12864				
Leu	Lys	Asp	Leu	Ser	Lys	Glu	Ala	Gln	Glu	Val	Phe	Lys	Ala	Ile	Gln					
		4275				4280						4285								
tct	ctc	aag	acc	aca	gag	gtg	cta	cgt	aat	ctt	cag	gac	ctt	tta	caa	12912				
Ser	Leu	Lys	Thr	Thr	Glu	Val	Leu	Arg	Asn	Leu	Gln	Asp	Leu	Leu	Gln					
	4290					4295					4300									
ttc	att	ttc	caa	cta	ata	gaa	gat	aac	att	aaa	cag	ctg	aaa	gag	atg	12960				
Phe	Ile	Phe	Gln	Leu	Ile	Glu	Asp	Asn	Ile	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Met					
4305					4310					4315					4320					
aaa	ttt	act	tat	ctt	att	aat	tat	atc	caa	gat	gag	atc	aac	aca	atc	13008				
Lys	Phe	Thr	Tyr	Leu	Ile	Asn	Tyr	Ile	Gln	Asp	Glu	Ile	Asn	Thr	Ile					
				4325					4330					4335						
ttc	aat	gat	tat	atc	cca	tat	gtt	ttt	aaa	ttg	ttg	aaa	gaa	aac	cta	13056				
Phe	Asn	Asp	Tyr	Ile	Pro	Tyr	Val	Phe	Lys	Leu	Leu	Lys	Glu	Asn	Leu					
			4340				4345						4350							
tgc	ctt	aat	ctt	cat	aag	ttc	aat	gaa	ttt	att	caa	aac	gag	ctt	cag	13104				
Cys	Leu	Asn	Leu	His	Lys	Phe	Asn	Glu	Phe	Ile	Gln	Asn	Glu	Leu	Gln					

ES 2 417 879 T3

	4355	4360	4365	
	gaa gct tct caa gag tta cag cag atc cat caa tac att atg gcc ctt Glu Ala Ser Gln Glu Leu Gln Gln Ile His Gln Tyr Ile Met Ala Leu 4370 4375 4380			13152
	cgt gaa gaa tat ttt gat cca agt ata gtt ggc tgg aca gtg aaa tat Arg Glu Glu Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Val Gly Trp Thr Val Lys Tyr 4385 4390 4400			13200
	tat gaa ctt gaa gaa aag ata gtc agt ctg atc aag aac ctg tta gtt Tyr Glu Leu Glu Glu Lys Ile Val Ser Leu Ile Lys Asn Leu Leu Val 4405 4410 4415			13248
	gct ctt aag gac ttc cat tct gaa tat att gtc agt gcc tct aac ttt Ala Leu Lys Asp Phe His Ser Glu Tyr Ile Val Ser Ala Ser Asn Phe 4420 4425 4430			13296
	act tcc caa ctc tca agt caa gtt gag caa ttt ctg cac aga aat att Thr Ser Gln Leu Ser Ser Gln Val Glu Gln Phe Leu His Arg Asn Ile 4435 4440 4445			13344
	cag gaa tat ctt agc atc ctt acc gat cca gat gga aaa ggg aaa gag Gln Glu Tyr Leu Ser Ile Leu Thr Asp Pro Asp Gly Lys Gly Lys Glu 4450 4455 4460			13392
	aag att gca gag ctt tct gcc act gct cag gaa ata att aaa agc cag Lys Ile Ala Glu Leu Ser Ala Thr Ala Gln Glu Ile Ile Lys Ser Gln 4465 4470 4475 4480			13440
	gcc att gcg acg aag aaa ata att tct gat tac cac cag cag ttt aga Ala Ile Ala Thr Lys Lys Ile Ile Ser Asp Tyr His Gln Gln Phe Arg 4485 4490 4495			13488
	tat aaa ctg caa gat ttt tca gac caa ctc tct gat tac tat gaa aaa Tyr Lys Leu Gln Asp Phe Ser Asp Gln Leu Ser Asp Tyr Tyr Glu Lys 4500 4505 4510			13536
	ttt att gct gaa tcc aaa aga ttg att gac ctg tcc att caa aac tac Phe Ile Ala Glu Ser Lys Arg Leu Ile Asp Leu Ser Ile Gln Asn Tyr 4515 4520 4525			13584
	cac aca ttt ctg ata tac atc acg gag tta ctg aaa aag ctg caa tca His Thr Phe Leu Ile Tyr Ile Thr Glu Leu Leu Lys Lys Leu Gln Ser 4530 4535 4540			13632
	acc aca gtc atg aac ccc tac atg aag ctt gct cca gga gaa ctt act Thr Thr Val Met Asn Pro Tyr Met Lys Leu Ala Pro Gly Glu Leu Thr 4545 4550 4555 4560			13680
	atc atc ctc taa tttttttaa agaaatcttc atttattctt cttttccaat Ile Ile Leu *			13732
	tgaactttca catagcacag aaaaaattca aactgcctat attgataaaa ccatacagtg			13792
	agccagcctt gcagtaggca gtagactata agcagaagca catatgaact ggacctgcac			13852
	caaagctggc accagggctc ggaaggcttc tgaactcaga aggatggcat tttttgcaag			13912
	ttaaagaaaa tcaggatctg agttattttg ctaaacttgg gggaggagga acaaataaat			13972
	ggagtcttta ttgtgtatca t			13993

<210> 319  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

10 <400> 319

gcctcagtct gcttcgccc 20

15 <210> 320  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 320  
 gctcactggt cagcatctgg 20  
 10 <210> 321  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 321  
 20 tgagaatctg ggcgaggccc 20  
 <210> 322  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30 <400> 322  
 gtcctcata ttgcatct 20  
 <210> 323  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 323  
 cctccctcat gaacatagtg 20  
 <210> 324  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 324  
 50 gacgtcagaa cctatgatgg 20  
 <210> 325  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 325  
 60  
 65

	tgagtgagtc aatcagcttc	20
5	<210> 326 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 326	
15	gccttctgct tgagttaca	20
20	<210> 327 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido Antisentido	
25	<400> 327	
	gcgccctctg cttgagttac	20
30	<210> 328 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 328	
40	tcgcgccctc tgcttgagtt	20
45	<210> 329 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 329	
50	cttcgcgct tctgcttgag	20
55	<210> 330 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido Antisentido	
60	<400> 330	
	agtctgcttc gcgccctctg	20
65	<210> 331 <211> 20 <212> ADN	

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 331  
 tcagtctgct tcgcgcttc 20  
 10 <210> 332  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 332  
 20 cctcagtctg cttcgcgct 20  
 <210> 333  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30 <400> 333  
 agcctcagtc tgcttcgcg 20  
 <210> 334  
 35 <211> 43445  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 334  
 40



ES 2 417 879 T3

accaagacag cgctcaggac tggttctcct cgtggctccc aattcagtcc aggagaagca 60  
 gagattttgt ccccatggtg ggtcatctga agaaggcacc cctggtcagg gcaggcttct 120  
 cagaccctga ggcgctggcc atggccccac tgagacacag gaagggccgc gccagagcac 180  
 tgaagacgct tggggaaggg aaccacactg ggaccagcc cctggtggct gcggtgcat 240  
 cccaggtggg cccctcccc gaggtcttc aaggctcaaa gagaagccag ttagaaaaag 300  
 caaacaggtc aggccggga ggcgccctt ggacctttg caatcctggc gctcttgca 360  
 cctgggcttc ctataaatgg ggtgcgggcg ccggccgcgc attcccaccg ggacctgcgg 420  
 ggctgagtgc cttctcgggt tgctgccgct gaggagcccg cccagccagc cagggccgcg 480  
 aggccgaggc cagcccgag cccaggagcc gccccaccgc agctggcgat ggaccgccc 540  
 aggcccgcg tgctggcgct gctggcgctg cctgcgctgc tgctgctgct gctggcggg 600  
 gccagggccg gtgagtgcgc ggcgctctg cgggcgcaga gggagcggga gggagccggc 660  
 ggcacgaggt tggccggggc agcctgggcc taggccagag ggagggcagc cacaggggcc 720  
 agggcgagtg gggggattgg accagctggc ggcccctgca ggctcaggat gggggcgcg 780  
 ggatggaggg gctgaggagg gggctcctcg agcctgcctc cctcctgaaa ggtgaaacct 840  
 gtgccggtg tccccctgtc gggccctagc acccgctggg aagacgtggg aagctcacag 900  
 atttctttct cctgtcttac agaagaggaa atgctggaaa atgtcagcct ggtctgtcca 960  
 agtaaggcat ctgcgcatgg ggcgtggaag ggcgccagc cccgtgcact ctcctacacc 1020  
 cgggtccctg agggcctccc actctacagg gctgagatgg catcgtggtg tgccttgctc 1080  
 tgacccagc aagcaagttc cctgagcctc tgcccacacc caagggatgc caactctctt 1140  
 ctacctggc ttctgttctg tccaaaagt tcagcctggg ggcgggggag ggaagggatt 1200  
 gtctctccgc tggcctgtgc acactttgaa gaaacatcac tgcctgttt atcagtgact 1260  
 agtcattgat tcgaagcatg tgagggtag gaaatactga cttaacctt tgtgaagaaa 1320

ES 2 417 879 T3

tcgaacctcc accccttcc tatttacctg acccctgggg gttaaaggaa ctggcctcca 1380  
 agcgcgaccc tgtgtgctgg agccgcgggg cggacttctg atggggcagc accgccatct 1440  
 agtggccgctc tgtcatcact gcagctggac tcaggacca gatgttcttt ttcttcaatt 1500  
 gttcagaaaa ttctctcaa ctacagtga aacctccaga aattcttttc taggagtttg 1560  
 ttaagttagt tacgcttaat gcttaatgaa ctttgcctta agtatttggg agtcttagag 1620  
 tcacggaatt acggcgtggt caagctaaaa aagcattaga gatagtacta tttgcgtaat 1680  
 gttgtcatct cttaatattgc cagagggctc ctcatgcaga ttttctgagc cccattactt 1740  
 gacacttgct actcccttcc ctgtgcctca gatgagatat tcaagacatg ccagccaatt 1800  
 taaacattag cctcagcaaa aacataatgg agaagtcaaa tctataaagg aaaattaagt 1860  
 ataaagtcaa ttaaaaaata atttgagttg aattaccatt ttaattctc tatgccactg 1920  
 cccctctctg cccagaattg gctgtccttg ggagagctat ttctgctatg tggctgacgt 1980  
 atttctcccc acgttagaag atgcgaccg attcaagcac ctccggaagt acacatacaa 2040  
 ctatgaggct gagagttcca gtggagtccc tgggactgct gattcaagaa gtgccaccag 2100  
 gatcaactgc aaggatgga ggatgcaggc aggagggacc tagagcccac agctttcccc 2160  
 cagccctggt ccagcgggcg cccaacacgc gaccttcccg gagggtgtgt actgagcaaa 2220  
 cgcagaacat cccagaactg ttgtaatctg atcaaagcac tgggactttg cctctgtttg 2280  
 taagtcagcc acattgctga gatgtggtct gccccacca aatttcgcaa gtcagaagta 2340  
 ttttcccggt aacttcccag atgcaatagg aatccatgat ctagattagc agcagtgtgg 2400  
 gtctgtagat ttcagcgtga gagaggccca gtaggtgagc tatgggaggc aggcaactcg 2460  
 gaatcgact gtgaaatgca gtttttataa tttaagtcaa acagaatctg ttgctgaaaa 2520  
 atgaatggaa agaagaaaaa aatataaaca tacagtttgt tctaaaataa aactttgctt 2580  
 attattgaga ctggttgtag tcatgttaca tacatgtgga gcagatctac aggctgctat 2640  
 tggggtttgg gtggggaaga gaagtcaagc tgagcagtca cttttttta gagagtaccg 2700  
 tagctcttgt atgtgctgtc caatatggta gacatgagcc acattgggct atttaaattg 2760  
 aatgaaatta aaaattcata ttcgttgtca cattagctgc atttcaactg ctcaacagcc 2820  
 accctggcta ctggctccca tattgaacag cacacatgta caacatttct ataaagtat 2880  
 ttgaatagtg ctggataata agtaggaatc cgttgaaact ccagctatat gcaaagctct 2940  
 aaataggccc taatagatat aaccagtttt ttgggtgaca ttaaggagac atttgctgtg 3000  
 gaaacgaagg atggccctct tcctgcttcc tgtttttctt cttcactttc actcctagtc 3060  
 tgcagcgctt ctatttaacc acagctcttt ataattaaag tgagtaactt tagaaccaat 3120  
 aaaaggacat cctccttccc atgcctaggg gcaaacttaa gaaatgtggt acccgggagg 3180  
 gggaaaacgt cagcaatagg actaagtcta ggttgggtgca cagagaacct aggaggcatg 3240  
 ttgataaggc atgtgggtgtt gagggcgagg cagtgggtgt cccagcacca ttccctttgg 3300  
 tgctctgatt agagattaag ccctgggctt caggggcccac ctctcattct tgatagacaa 3360  
 cctcaatgct ctgctaccct gaattctcag gttgagctgg aggttccccca gctctgcagc 3420  
 ttcacctgga agaccagcca gtgcaccctg aaagaggtgt atggcttcaa ccctgagggc 3480

ES 2 417 879 T3

aaagccttgc tgaagaaaac caagaactct gaggagtttg ctgcagccat gtccaggtaa 3540  
gtcatgttgt acatgagcac acgcatgtgt gtgtgtccgc tgaggatga acttgttgt 3600  
ttgcaccagg cacggatgtg actgtaagta tttgtattcc gtatccatcg tggatcaggg 3660  
aattactgag ttttcacaat catcaaaaag agagaagcat tagttaacct tccctagtta 3720  
ggttccttta attatcattt tcatgtgttt ctaaaaatct catgctttaa acttcttgag 3780  
attataaaac tgagatgctt tgtttaaaca agtgaattct tatttaaaga actagtcaag 3840  
actagtgctt ggtggtcttt ggtgtggggc cccagaggca ctggctgctg tggccggcac 3900  
atggcggggc agggctctgt caccgcaggg cagaggagca ccaaggcttc ggtggctccc 3960  
cctcctaggc tggcattcag ccactgcacg ctgatcggcc actgcagctg catctctgct 4020  
gactggtcag gccccatgtc gcacccattg taaatatttt caacatcacc cctgcctcat 4080  
cctcaatcac agttttagg gtcctaggtg tgtatgaata caggcaggat agagttgta 4140  
acttggtagc atcagaaaac tctgtctgta ttagtctggt ttcattgctg tgataaagac 4200  
atactgaga ctgggcaatt taaaaagaa aggtttattg gactcacagt tccacgtggc 4260  
tggggaggtc tcacaatcat ggcggaagg gagggacagc aagtcacatc ttatgtagat 4320  
ggtggctggc aaagagagct tgtgcagaga aactcctggt tttagaacca tcagatctcc 4380  
cgacacccat ctgcaatcac gagaacagca cgggaaagac ctgccccat gattcaatca 4440  
cctcccccg ggtccctccc acaacacgtg ggaattatga gagctacgag acgaaatttg 4500  
ggtggggacg cagagccaaa ccatatcacc atccttgccc atttttcagt tttgctaaac 4560  
attagattca gatgccagtc ctttcttgcc aaaataggct gtgaggcttc tttctttcct 4620  
atgctttatt ttctccaaga cttaactgta tatgaggag aggggatgg tggcaggagg 4680  
aaagagtggg ttattttttg gtccttggtc ttctccaaat acagaagaga ctctgttct 4740  
tgaaaaggag ggctttccat gtttgcactc tcatgacttt aactgtcttt tttaaaaatt 4800  
gacatacaat aattatacat atttattgag aacatagtga tattttgata catgtaatgt 4860  
atggtgatca gatcagagta attagcatac ccatcatctc aaacatttat catttcttcg 4920  
tgttgggaac tttctgagag agtgtaggct gtgggagata agtccgtcac ctttctctc 4980  
tgatgtaacc agagtggctg cagccaggtc ctcaaaaact cagagagtac ccagtgggaa 5040  
atccctaaga ccaaagtcag catgggcttc agccatggcc tgacaccata caaaagaatg 5100  
actgtccaac aagtgtatga aaataagctc caattcactg gtagtcaaga aatgcgaatt 5160  
aatgtaacaa caagatattt atctgctttt acccatcata ctgcaaaaact ggaaaacagt 5220  
gatagcacct gttgctggca ggccagtgag gaaaagtgtg ctgtcctgag ctgctggtgg 5280  
aaacgagagc catcaggcaa tatctactgt aatttaaaat acttaatacc ctttgacaca 5340  
gatattttag tctttgggac tctagcccat gaaaataaaa gcagtaatgt gtgaagatag 5400  
gcacataagg atgtttgttt tggattgtt gtgtgtggtt aaaaaaatc cagaaagaga 5460  
gagggcaaat gccatcaaat ggggcaatgt gtgaataaat tatatttagc catggaatgg 5520  
aatgttctgc atgcagcttt taaaaaatc tgttagagct gtaccaagtg actcagaagg 5580

ES 2 417 879 T3

atttttgtga agtataatta agtgagaaaa acaagataaa agtatgcata atacaatgcc 5640  
 acttgtataa aacaacaat ggcaaaatct ttgtatgact ctgtttgcac tcacccatgt 5700  
 ttacagagga ttgtatgagt gtgcagaaac aaatggaaca accactcggg tgtccgtatg 5760  
 gggaggatgg gcaaagagac tgatatgggt ggagaacaga gcagggctgg atgagccaag 5820  
 caaaaaaagt taaaacacag ctggacctgg tggctcatgc ctgtagtccc agcacttttg 5880  
 gaggccgagg agggagaatc acctgaggtc aggagtttga gaccagcctg gccaacatgg 5940  
 tgaaaactgt ctctactaaa aatacaaaaa ttagctgggt gtgatggcac atgccagtag 6000  
 tcctagctac tccggaggct gaggcaggag aatcacttga tcccaggagg tggaggttgc 6060  
 agtgagctga ggttgcgcca ttgcaactca gcccgggcga ccgagcgaga ctccatttca 6120  
 aaaaaagaaa aagaaaaaag aaaaaaagaa aaaaaaagaa tcaccaaaac ttatgtatat 6180  
 gtgcatactt ttttgaatat gtatgtctat gtgtagctat attctatatt tacaataaaa 6240  
 tgatgtcaga agaacaattg gttaaaaaaa tatgagaaaa gaaacttcag tgccaccag 6300  
 cttacttcca gcaagttgta atggagaagg acatttccgt gaccatcctc tctctgggac 6360  
 aggtatgagc tcaagctggc cattccagaa ggaagcagg ttttcttta cccggagaaa 6420  
 gatgaaccta cttacatcct gaacatcaag aggggcatca tttctgcct cctggttccc 6480  
 ccagagacag aagaagccaa gcaagtgttg tttctggtga ggatttagaa agctgatagc 6540  
 agtggccctt gaaactcatc ttcatgtgtt agagaccagt cctaccatat acaaagcaga 6600  
 tcactgagtc agctccatga ctagttacat aggaagccct ggattggcgt gaaatactgg 6660  
 tgcccagggt tcctcctgcc ccttaggctc actgacagat catcccaagc aggttatca 6720  
 ggttgggtct aattttaaaa cagtcattga ggagtcctgg ccaccccacc cctgcttttg 6780  
 tttgatgctt cacctgtggt tgctgggtta tgggtgtacac agtaaatcct gtgtgtattt 6840  
 taaacaccaa aaataatggg atctgttgct ggtctctttt acgaatttca ggtttactg 6900  
 tgagacagaa ttcatttcac ctcagtccca tgagcacttt tgtgtgttct aatttctcta 6960  
 cgacaccata atgggagaag acaccgatgc aacctgcgga ggcctttctg cagaccacc 7020  
 ttaactggt tttctctctc ccaacttggg ctggccaggc actagcaaga ccacactctg 7080  
 cataggaaga aaaagaaagt ccctcccaa gctagattcc ttctgctttt tctttcacga 7140  
 tccccacccc atccctccca agtacccaag gatgttgccc gtgttgaata catgtggttg 7200  
 catcttctc ctccatagga taccgtgtat ggaaactgct cactcactt taccgtcaag 7260  
 acgaggaagg gcaatgtggc aacagaaata tccactgaaa gagacctggg gcagtgtgat 7320  
 cgcttcaagc ccattccgac aggcattcag ccacttgctc tcatcaaagg catggtaagt 7380  
 cccatgtcag cactgtcgtg cacagcaagg agcatcctt tattaataca attccagaac 7440  
 ttttgagcta gtgggcacct ttgaggacag cctgccctgg ctgtttttta tacagactag 7500  
 agataggacc ctgagcaggc acgggaaggt ctgcccaggc ttcacggcct gggatcagtt 7560  
 gagccaaggc ttgagtcagg ctctccctc ccagcccaga gctctgtctt tcctcctgtc 7620  
 cttctgtcac tggcaccaaa ctgcctctaa tctcatcact tgagagtaat gactactcac 7680  
 ctctgagaag gttccgggga tggatgtagg gcagcaaac caccttctgt tcttttctgc 7740

ES 2 417 879 T3

acaaggactc cttgtgccag ctccaagcct ctggcctttg aagaagtccc aagacctgtg 7800  
 ttctccccct ctccctcatc ccatgaagtg gagtgactta gagtgctcca gcttcttgtc 7860  
 cttccacccc cagtaccacc ctgaccaaac atggccccac tgccaccggc ctggagcacc 7920  
 ctctcctctc tgттаactgg ggccatggag caccatatta cctgagcctg cctgaccctt 7980  
 gcaacatcct ccctgatatg agccccagcc tgtctcagtg aacatgaata acttgggcaa 8040  
 tcactgtcat gctgggcgct gttcctggtc attgtcctta gggttgaaaa cagggagtct 8100  
 gatgaccatg agtgccacag tcagaagagg ataatgcact ggcttagggg tcttttctga 8160  
 gcatctgctg tttgctcaac cccactctgg gcagcaccaa ggaagggaca gtggcagatg 8220  
 aacatggac cttcccctca ggatgcttcc agtctaatgc aggagccagg tcaataaagt 8280  
 atacgtggtg tactcaataa ggtgataagc tgaacagtgc agacaagaag tcctgggacct 8340  
 gaccaggaag gagaaagaat tattcatgta gctcagcggg caacatttca tggaagatgt 8400  
 ggagcaggaa cccaaaaaat gcaaaagaata tgtaaatgaa agagacatgt aagaatgggc 8460  
 ttttgggcaa agaaaagtta ctgagcaggt gtgtgagggg ctatgtgggtg ggatgggcat 8520  
 gtggaggata caaagtttag acattgtcca gtgaggggtg aaaaagagga gtctacagct 8580  
 tgactcagct ttggggatgc cgacttgttg caccctctgg tctaaatgtc aagtaccag 8640  
 ttatcttctt tctctgagtt tatctagtgg tacaggactc ctgctccctt ctaccttga 8700  
 ggtaaagtct ttaacagaa gatacagga ctgatcaaaa tgctcgtctc caatctctt 8760  
 catagaccg ccccttgtca actctgatca gcagcagcca gtcctgtcag tacacactgg 8820  
 acgctaagag gaagcatgtg gcagaagcca tctgcaagga gcaacacctc ttctgcctt 8880  
 tctcctacaa gtaggatcat tgatgcaccc ctgatttgtc atttaatggg tcagtgtgaa 8940  
 ctgaacactt ctcaagtgtc ctgttccagg caaacctgtg cctgggaggg agaatggag 9000  
 agggataaaa tgccgcccct ccctgtcccc ctttttaagc gaacaggcca tttggcagaa 9060  
 aagtcctagg catgcaaac aatccaagac caacaaaaga tatctaagac ccattcttta 9120  
 agggctgtag atccagaaaa cctgaggatc actgcagggt accctgggta gaaaaggttt 9180  
 catggaagat ttgggatact gactggaaac ttgtgtatcc aaatccactt tgaaaactga 9240  
 taatcaatga atatatattg agtaactgcc atattcttgg ctctatgttg tggaagatac 9300  
 gaaagaattt tgagacattg cactagtctc tacctctggc cactccagac tagtggagag 9360  
 tataaggcac gcatgtcttt ttgatgggag gataactagc gtgaccagga agaggtggat 9420  
 gttattcatt cagggccaac aatggctgga tttacccatg ctttgaaaga tgggcaggac 9480  
 ttgggtagat gcagagacag ggaaaacctt caacatggaa agaatagtat gttctggcca 9540  
 tccgtgacat ggtgtgcttc cttggttacc aggaataagt atgggatggt agcacaagtg 9600  
 acacagactt tgaaacttga agacacacca aagatcaaca gccgcttctt tgggtaaggt 9660  
 aagagtttct gtccacatag ttgctggaaa atctactcaa gatgtgccta tcatggctta 9720  
 gccacttgct gagccctggt aaatgtctgc tgactaacia gtgatacaga cactggtggt 9780  
 ctggctacct ctagtgagaa agcaaaactca tttcatgatg tcaagttgca atggcataaa 9840

ES 2 417 879 T3

ggaaaagaag ttcccaaagc tacttaggca tttgtaaata gaaaactgga atcctaagtt 9900  
 taacatgaca tatttgatag aactgacatc acccatcctg tgataagatc cagagctgtc 9960  
 ccagacgagg tggaccaagt gggagagaac cttcagagtc tggccagata gtaacctcag 10020  
 gagtcagctc ttagaggtag aaggaaactct aacaatctca agtccaaccc ttaccagta 10080  
 ttgtattgta tttatatctg tccaaattcc ttcttgta caaacctcatt gtcctttttg 10140  
 ctcatagcaa cctgtgatgt caggtggtag agatgtgatt ttatacctat tctacagagg 10200  
 agacagtgac acagagaggc ttagagtttg atgtagtcaa ggccgcagaa tattagaggg 10260  
 gggaaaataa gtgccagggt gtaatctaag ccaggactat tctcattaca ccacatttcc 10320  
 atgatgactt ttacctctct tcctggcata ggtcacagta ggtggtggag aggatacaaa 10380  
 agtgtctccc ctccccacaa gctgctggta gaccaatta gaagaaatgg tgataagcac 10440  
 ccatgtgcct ggtcccagtt gtaaccatgt caacagtagc acctcctcac caattatttc 10500  
 aagctaaggg taacctgatg atagactcag acaagtctgg attccacttt agctctacct 10560  
 cttagaccct gagagctctt gggaaaccta agttgctcat ctctgggtca cacttcctca 10620  
 tctctgggtc tcatctcttt gtctcatctc tgggactcag agctgagatc cagggatgag 10680  
 caatttcat ggcccaaaaa ctctgtgggt ctcagaagca gggctgaatt tatcattaaa 10740  
 ttgaacaata atgccacccc acagggatag gatgatgagt cagtgaaaac aagtcaatca 10800  
 cctatggcag agccagatct agcaggcatt gaatacagga tagtttcttt cccttttccc 10860  
 ctgtgctgat actccacaat ttccagcttc cagtagacaa agatatgggt gagatgaaga 10920  
 aagctagagt tcctttgaca ctttccatct tccaggtact aagaagatgg gcctcgcatt 10980  
 tgagagcacc aaatccacat cacctccaaa gcaggccgaa gctgttttga agactctcca 11040  
 ggaactgaaa aaactaacca tctctgagca aaatatccag agagctaatc tcttcaataa 11100  
 gctggttact gagctgagag gcctcagtga tgaagcagtc acatctctct tgccacagct 11160  
 gattgaggtg tccaggtatc taatggttac agctcaactt tttataaaac tgatggtaac 11220  
 tgactgaact ttcaaactt ggccaaatgg agaatctcag ggaccatttg gatataatc 11280  
 cagttaatca attagtcaat cagttcatga ttgctggata gagaactatc agctgctgcg 11340  
 ctgagttcca tgaaacacac acgcgcatac tgtgttcaag gcagctatgt atttgtgtgt 11400  
 taaaacagaa ggagaatagt tcccacattt tgatgggtaa cttttaattc ctaggctctat 11460  
 tgcaggtgct ctccagaagc ttataggctg gtggagagag aactcagacg aaaaataa 11520  
 tatgatttct ctacccttca aggcaactgg ttaagtgtc atgaaggtga gagaaggac 11580  
 tgaggccagg aatgagaccc agctaagtgt ggccaggcat attctgtgtg ctggccaaag 11640  
 gactgtgata acagtcttct tgttgctaca gatccacagt cccctcttg aacttttctc 11700  
 gattgggctt cttctgtggg taatattcct aaggaaagca tcatggttct gagctccaag 11760  
 ttgggttttg aagttagatt tgaatagtga atgaggtgat taagggtctc cctggcagag 11820  
 gacacacat gagcaatatt ttatgtgcc tgaaggtggt ctgtataact ttatccatgt 11880  
 ctttcttctc agccccatca ctttacaagc cttggttcag tgtggacagc ctcagtgtc 11940  
 cactcacatc ctccagtggc tgaaacgtgt gcatgccaac ccccttctga tagatgtggt 12000

ES 2 417 879 T3

cacctacctg gtggccctga tccccgagcc ctcagcacag cagctgagag agatcttcaa 12060  
catggcgagg gatcagcgca gccgagccac cttgtatgag ctgagccacg cggtaacaa 12120  
gtgagtttcc acactgtatt tctcctccta ggagcagagg aacatcttgc acctctgtgc 12180  
atctctgtat taaaactgaa cccctccttc cactttcaaa ctctgctcct tactcttctg 12240  
tttttcttgg atcatttttg gggtaatgac ttgaaataag aaatcagcaa acacaaattg 12300  
aatttttaa aatattttct ctacattata ttataaaagt ttttgaacat agcaaagtgg 12360  
acagaatttc acagggaaaa cccctagaaa accagctatc tcctactatt taagtgttat 12420  
tatatttgct ttatcacata tacatccatc cattaattca tcttattttc tgaagcattt 12480  
caaagtaaat tgcaaacatc aacacacttt cccctaagta ttacagcttg catattatta 12540  
acttcagttc aatattagtt agcagttttt tcctctgaat tttttgttt gtttgttttg 12600  
ttttttttg ttgttgttgg tttttgaga tggctcact gtgtcaccca ggctggagtg 12660  
cagtgatgca gtcacggctc actgaagcct caaatcctg ggctgaagtg atcctccac 12720  
ctcagcctcc tgagtagctg ggaccacagg tgcatgctac catgcccctg ctaatttttg 12780  
tattcttggg agatacaggg tttcaccatg ttgctcaggc tagcaggttt ttcctttgat 12840  
gaaattttt ggctttttct tttttacatt tttatataaa tttatgtgga acaagtgtaa 12900  
ttttgttaca tgaatagatt gtgcagtagt taagtcaggg ctttcagggg atccatcacc 12960  
cagacaacat atagtgtacc cactaagtaa tttctcacca tccatctccc tccacttcca 13020  
caccttctga gtctcaattg tctatcattc cacacactat gtccttgtgt gcacattatt 13080  
tcactccac ttataaatga caacacgcaa tatttgtctt tctgtgactg tcctgtttca 13140  
cttaagacaa tgacctccag ttccatccat gttgctgcaa atgacatgat tttattcttt 13200  
ttatggccga atagtatttt attgcctata catttcacat ttttaacca atcgtccatt 13260  
gatagacact taggttgatt ccatgtcttt gctattgtga atagtgtgtg gataaacata 13320  
tgggtgcagg tttcctttgg atataatgat ttcttttctt ttaggtatat acccagtaat 13380  
gggatgttg gatttattgg tagttctatt tttagttctt tgagaaatct ctgtattgtt 13440  
ttccatagtg gttgtactta tttacaatcc catcaacagt gattaactgt ttccttttct 13500  
ctgtatcctc accaacaact gttatttttt gtcttttgaa taatggccct cctgactctt 13560  
gtaagatggt atctcattgt ggttttaatt tacatttctc taatgattag taatgttatg 13620  
cattttttca tatgcctatt gccatttcta tgccttcttt tgaaaaaat gtctattcat 13680  
gtcctttgcc tactttttta tgggattatt tgggggattt ttttgttgag ttgtttgaat 13740  
tgcttgtaca ttccggatat tagtacccca ttggatgaat agtttgcaaa tattttctcc 13800  
cattctgcag gttaccacc tgttgattat ttgttttact gtgcagaaac tttttacttt 13860  
aattaagttc tatttctcta tttttgttt ttgttctctt tgcctttgag gtcttattca 13920  
cgaattcttt gtctaggcca atgtccagag aagttttccc taggttttct tcttgcattt 13980  
ttatagtctc aggtcttata ttttaagtctt tgatccatct tgagttgatt tttttatag 14040  
gtgacagata ggagtccagt tttattcttc tgcatatggc aatccatctt tcccagcacc 14100  
acttatgaa aaggggtgctc tttccctagt gtatgttttt gtcaattttg tcaaagatcc 14160

ES 2 417 879 T3

gttgactgta agtatgtgac tttatctctg ggttcagtat tctgttccat tgatctatgt 14220  
 gtctatcttt atgccagtac catgctgttt agattactat agccttggtg tataatctga 14280  
 agtcaggtaa tgtgatgcct ccagctatgt tctttttgct taaaattgct tcagctattc 14340  
 aggctctttt tggattccat atgaatttta taattatctt ttctaattca caagtttggg 14400  
 ttttaagaca aacctaactg gggttaccaa gtcctgactc tcttctctta ttctgtagct 14460  
 atcataagac aaaccctaca gggaccagg agctgctgga cattgctaata tacctgatgg 14520  
 aacagattca agatgactgc actggggatg aagattacac ctatttgatt ctgagggtaa 14580  
 tctcagctct ttatatgaca tacatcattt cagaagcact tttcctggac accttttact 14640  
 tcctctctct gcaccctgat gggttcttct ttcttttctt caatgcaggt cattggaaat 14700  
 atgggcaaaa ccatggagca gttaactcca gaactcaagt cttcaatcct gaaatgtgtc 14760  
 caaagtacaa agccatcact gatgatccag aaagctgcca tccaggctct gcggaaaatg 14820  
 gagcctaaag acaaggtaaa gtccacaaga agaggtctga aagtgaaagt ttattaacaa 14880  
 ggatttgtaa ggtactaggg gaatgagact ctagatttca tctactgact ttattctgct 14940  
 gtttctttcc tttccttctt tccttcttcc cttccttctt ccctccctcc ctttcttctt 15000  
 tccttcttcc tttccttctt tcgagatgga atctcactct attgcccagg ctggagtgca 15060  
 gtggcatgat ctgggctcac tgcaacttct gcctcctggg ttcaagcaat tctctctgcc 15120  
 tcagcctctt gagtaactgg gattacaggc atgtgccatt acaccagct aatttttcta 15180  
 ttttttagta gagatggagt tttgccatgt tggccaggct ggtcttgagc tcctgacctc 15240  
 aggtgatccg cctgcctcag ccttgcaaag tgctgggatt acaggcgtga gccactgcac 15300  
 ctggcctcta ctgttttcta attgcaaatt tcaacaagcc tattgacttg actgcctagc 15360  
 agtatgtgac gtgagagaaa tacttgactt tgctgctatg tcaacatgca gaacgtgaga 15420  
 tgtttttgct tcctaccgtc cacctaccag attgaccatc cctctcatca tggaaaaaca 15480  
 tgcttaattt tcccccaata agcttaggct aggatagcca acttgcccc ctcttaggtg 15540  
 caaagactcc agaactttgg aaactaccct atttattagc cccaaactct tactaccctt 15600  
 tctcatcttt atcctcatat taaaataact tacgttaaaa caacttgatt ttcacttagt 15660  
 ggtgatctc caaacaatc acaacttggc cataatttat gtgttttaat ggaattgaat 15720  
 tcaacaggca ttccacaggc ttttctggg aacccttact tgatagtgtc ctaggaaaca 15780  
 ctggcaagaa gattcaatac cagcatttga agaacgatta cagagaaatt agacctgtgc 15840  
 ttaagaaaga gctagcagac aatgccagtg tttgccaggc atgttctgtg ttctgaccac 15900  
 aggacagtga taaccatctc ctcttttgac tgcaggacca ggaggttctt cttcagactt 15960  
 tccttgatga tgcttctccg ggagataagc gactggctgc ctatcttatg ttgatgagga 16020  
 gtccttcaca ggcagatatt aacaaaattg tccaaattct accatgggaa cagaatgagc 16080  
 aagtgaagaa ctttgtggct tcccatattg ccaatatctt gaactcagaa gaattggata 16140  
 tccaagagta agtaagagct attcacccca tatacactg agggccctga gctggaattc 16200  
 caaccctagg ttttggcata gccactgtct gcccttgctt ctgaaacaaa cacttgtgca 16260



ES 2 417 879 T3

aatgtgtagc agatctagac ccaaagactt aggggtcaatg aaatcaagac attttggtag 16320  
tgattggaaa tccatattta cttgggggtgc aagagtcaaa ggataataac atgggtgtgtc 16380  
agctcaaaat ataccttctt ttatctagtc tgaaaaagtt agtgaaagaa gctctgaaag 16440  
aatctcaact tccaactgtc atggacttca gaaaattctc tcggaactat caactctaca 16500  
aatctgtttc tcttccatca cttgacctag cctcagccaa aatagaaggg aatcttatat 16560  
ttgatccaaa taactacctt cctaaagaaa gcatgctgaa aactaccctc actgcctttg 16620  
gatttgcttc agctgacctc atcgaggtaa gtgtgaagag tttgaggttc tctagcccat 16680  
tttgtacagc atcataaaca gagagtccct gggagccagg agctaccagc aggaaaacta 16740  
agaaccacca ggcacttctt accatgattc tgaggctttc ttctttccct ccttccccgc 16800  
cttctctctt ccccgctagg ggtcacctga agcatgactt cttaacatta atagaaatgc 16860  
aggcctggcg aggtggctca ctctgtaat cccagcactt tgggaggccg aggcgggttg 16920  
atcatgaggt caggatatcg acaccatcct ggctaacacg gtgaaagccc atcttacta 16980  
aaaatacaaa aaattagccg ggcgtgggtg caggcacctg tagtcccagc tacttgggag 17040  
gatgaggcag gagaatggcg tgaaccagg aggctgagct tgcagtgagc cgagagattg 17100  
cgccactgcg ctccagcctg ggcgacagag caagactcca tctcaaaaaa aaaaaaaaaa 17160  
aaaaaaaaatg aaatgcaaat gtctcgtctt taagtcccaa agccaaggaa gcatatgtgc 17220  
tgcctagtca gatctgcttc aaatctcaaa tcaactccaa ctctgaatcc tttgttgaat 17280  
tatttgcctt atctgaacct tagctgcctc ttctagaaaa aagcaagtaa taaggtcaag 17340  
attctagtga gattttaata aagcagctcc tgtgaaatgc taaggtcagc tcctggcctg 17400  
tggatttcaa atacctgttt agataaatgg acatcaagag tggggactac taggctggca 17460  
tacaacaaag aaacctgatg ccattttctt gtctgatttt ctttctcaga ttggcttggga 17520  
aggaaaaggc tttgagccaa cattggaagc tctttttggg aagcaaggat ttttccaga 17580  
cagtgtaaac aaagctttgt actgggttaa tgggtcaagtt cctgatggtg tctctaaggt 17640  
cttagtgagc cactttggct ataccaaga tgataaacat gagcagggtg gtatttgtga 17700  
agtatcttct taaggaaagc tttgggtctc aatgcaaaaa caattctttt ctaagcatgg 17760  
aagtcctcaa aatactatct aactgaaggg ataactatgg tttttatcaa ccagacctgc 17820  
tggggtaagg gccagtatcc tctgcagtta aagatctcct gaattcagtg tgcccagaaa 17880  
ccagactcac aataagtact ctaggataac aagagtatga actctgggct ggggtgtggg 17940  
gttcatgcct gtaatccag cactttggga ggccaagggt ggccagatcac aaggtcagga 18000  
atttgagacc agcctggcca acatactgaa acccctgtct tactaaaaat acaaaaaaac 18060  
tagctgggca tggtagtggg tgcctgtaat cctagctact cgggaggctg agacaggaga 18120  
attgcttgaa cccgggaggt ggaggttgca gtgagccgag atcacgccgt tacactccag 18180  
cccgggtgac agtgtgagac tgtatcttaa aaaaaaaaaa agtatgaact ctgggcatag 18240  
atttaattct aacttccctg tcttgaagct gtgcgactt ggggaagttg gttgatatta 18300  
tgtgtatctg tttctgtctg tatcccagac tactaataac agtccaaacc tcacaaggtt 18360  
atttaaagac aatgaaataa ggcactaaa atgccaagca cagtgcctga tgctggcatt 18420

ggttgttcaa taagcagaca ctattacgag ttctaaatta atatthttcat tattattaac 18480  
 tgctgtcttt ggctctcact cccatcagtg cactagcaaa tgagaccaa cttccacttt 18540  
 gaagctagca atgagcccc atttaaggag ggaaataggt tgtatgatct ggagcttatt 18600  
 cttgaattht ttgctacca aagtgtggtc tggtcagaaa tacagcttct catgcttcac 18660  
 ccacaatcta ctgaatcaga agcgcatttt agcaagacct catgtgactt gtatgcacat 18720  
 tcaactttgc agagcaaggc agtaatttac ccctccaggc tcaactgttg gcacgagctc 18780  
 catcttctaa thtctgacc cccacttgag gccgaggatc thtgatctgc thtgagtctg 18840  
 tcagthttcac atthttthtt tcccaatgcc tgggcatcca tctctgagat tcttcttctc 18900  
 tctgagaaga acttgtctag gatcaagtgt thttcaaac tctggtgaa ttatataaca 18960  
 gctacattht cttaagaaac accttgtagt cttcaactgg caaagaagag aaggctaagc 19020  
 agggaacggg tgggggatag aggatcttct aatcttgagg atcctggcat actggagaat 19080  
 agggaccctt cctctcatcc caccacatct tactatgtct acagatthtt taattaagaa 19140  
 tagctthtag agtgccacta tccctgacaa gaccttagtt cthtaatctc tgcttagagg 19200  
 aattagctg gacttcagtg tctccctgtt cctcacctgg agcatthttt aggcccatcc 19260  
 tggctgcatc agacaggctc cacattggga actgaaaggt gthtgacatt gctgacatct 19320  
 cactggccat thtattacta aactctcagg atatggtaa tggaaataat ctcagtgtht 19380  
 agaagctgat taaagattht aaatccaaag aagtcccgga agccagagcc tacctccgca 19440  
 tcttgggaga ggagcttggg thtgccagtc tccatgacct ccagctcctg ggaaagctgc 19500  
 thtctgatgg tgcccgcact ctgcagggga tccccagat ggtaagtcag caggccccac 19560  
 tggggccca tgagaccaga cgttggthtt thtttagatc gccagactc ccttacgatc 19620  
 ccagctgcac aagcccgaaa agatgcttgt actthttca gagatggagg thtgcttga 19680  
 atthcactga agatgactct tggatcacat ggaaatgtha acatthgaa atthaagctat 19740  
 tcataatgth agctgtatth ttaagagcat taatthattc atctggaaaa caatgttcgg 19800  
 tataccttht tctaccttht ctgaaggctc thttatthtt atthttatth thttaattht 19860  
 thgagatgga gthctgctc caggctggag tgcagtgata caatctcggc tcaactgcaac 19920  
 tctgccttht gggthcaagc aattctcctg cctcagctc ccaagtagct gggactgtgg 19980  
 acgtgcacca gcatgcccg ctaatthtg tathctthtag agagacaagc ctgttgacaa 20040  
 ccagctcagg ctggthttcga actcctgacc tcaagtgatc ctccagctg ggcctcccac 20100  
 agtgctggaa taacaggtgt gagccaactgc acctgacctg aaggtcctth taagatthgaa 20160  
 atgatacaat gattataaaa gaaagtatth ggcaaacat aatthcactat ctaaatatgc 20220  
 tataatthtt atthattaat cataaaagga aatataaaa tgtactccta tggcttgatth 20280  
 aaaaaaatgt tgactthtaag aaaacaggtc tcaagctatth thattgaaat atthattaaa 20340  
 aaataaaacc caatgcaaat tgatatgtac atcatctcaa taggccttht gthtcaaaaa 20400  
 atthgattth tcaataatata atacatthca agtacaccth cacttacagt cagactccag 20460  
 aacaccagaa thagccatg gcatatatga tactthaaagt ccataaagct ctgaggccca 20520  
 gcaatathct taagagcctt ctgagthccac thgaaaatga catgatathc atctagthgaa 20580

ES 2 417 879 T3

atttcttata tcctgattca ctgaaaacgg taaaaacatc agtttgatct ttatttatca 20640  
 aactattcag ctcatcaaaa tatgctagtc cttcctttcc agataaagag gaattactct 20700  
 ccaatgatg ggaggttgta attaacaaaa cgcactttaa aaagacttac ttttatttgc 20760  
 tctcccttgt tgggtctaca gattggagag gtcacagga agggctcaa gaatgacttt 20820  
 tttcttcaact acatcttcat ggagaatgcc tttgaactcc cactggagc tggattacag 20880  
 ttgcaaatat cttcatctgg agtcattgct cccggagcca aggctggagt aaaactggaa 20940  
 gtagccaacg taagattctg tttgcctttt gatttcttag gttattactt tcttccaggg 21000  
 tgcatttctt gttaaaacat atttaaaaat gtgtttccac ttcaagacaa aatgcttcat 21060  
 cattgtaatc acctcattat ttttttatga aaaacttcaa gcttccacca gaatgacta 21120  
 cctcactagc tccagtagtg gtatggccat aagacaagaa ctcagttctc tcaacaaatg 21180  
 agtattccta tcatcttttt aatctggttt tgcctcacgt taactcaggt gctttctagt 21240  
 tctgggtagt atactccaac tctagagaac tgagaactcg ctttccttct tccaaacaaa 21300  
 tcccagtaat gtttccaaag gtctgagtta tccaggaaat ctttgcccgg aggtgagaaa 21360  
 ggggtggtga tctgactgac aggggactga agtatttaat gaatctgaat aggttgtttt 21420  
 ctgacttata gatgcaggct gaactggtgg caaaaccctc cgtgtctgtg gagtttgtga 21480  
 caaatatggg catcatcatt cgggacttcg ctaggagtgg ggtccagatg aacaccaact 21540  
 tcttccacga gtcgggtctg gaggctcatg ttgccctaaa agctgggaag ctgaagtta 21600  
 tcattccttc cccaaagaga ccagtcaagc tgctcagtg agggtaattc tttcagccaa 21660  
 gtctgcctag ccagtttgaa agagagaaca gagaatgtac ctgcagaatt ttgccaggct 21720  
 aaacagttga ttgagatcat tcaggtcctg aggaagcagg agaggagttag aaaggaaaga 21780  
 ttccgggtta cctattttta ttctagccta gacttactac ataactacat aattaccttt 21840  
 ctttactttt tcacatttta ctaaactgtc ctttatcttt ctgctttgag acttattaag 21900  
 acctactgct taattagttt ttattaagtt gtgatttttt gttatctatt tgttttgaga 21960  
 atgaagaaac aatagctctg gagagatcat ctttgaaaa ttaatatttt ccccccaaa 22020  
 aaatacctaa gaacatattg atttgaggtg gctaggtagg taaagcatga aactcctaac 22080  
 ctcgtgataa tggaaacag cctcttttgg agagtccat ttttaagtggc accctcaacc 22140  
 attgatttgc cttagttttc atattttaga cacattcatg tgttcattca aaaataatat 22200  
 ttaattggcc agccacgggtg gttcatgcct gtaatcctag cactttggga gccccagggtg 22260  
 gatggatcgc ttgagccctg gtgtttggat accagcctgg gcaacatggc aaaaccccat 22320  
 ctctacaaaa aaaattaaat aaataacaaa attagccagt cgtggtggca catgcctgta 22380  
 gctccagcta ctcagaaggc tgagatggga ggatcaactg agcccaagag ttcaagcctt 22440  
 cagtgaacca tgcttgacc actgcactcc agcctgggag acagagcaag atcctgtctc 22500  
 acaaaaaaca aaaatagta tatttaattg cctaataat accacgtatg ttgagtgaga 22560  
 cacacaaggt ccctgacctt tgaacgctta cattttataa gggagacaca caattaagca 22620  
 agcagtaatc atagagtaag ggctaagtta tagaaagtat tagagtacca tgaaatttta 22680

# ES 2 417 879 T3

tatcatgtag cctgtgctag tcagggaatg cattctgaag caagtgtact tgacctgata 22740  
actgaggact gtgtcagagt catttaggca aaggagaaaag gagtgagtgt tccaggcaaa 22800  
aggaaaagca tgtaatggcc tgaaggtaaa ggaatatggt tcaaggaact ggaagaagtg 22860  
cagaatggta aggggctcag agatgatggg gagaggtagg caggggagag agcatgcca 22920  
gctgcgaaag ccatcctaag gagtttgac tcttttgaag gcacaggagt tgaaaagggg 22980  
agcagaaata agataggggt gatgttttag aagaaatact ctgactctag tgtggaagat 23040  
gggtgagaag gaggcacagc tggacacgaa gagaccattg gacatctctt acgatcctat 23100  
gtggctaaga gctgataatg gcctgcagtg gagaaaagcc aggtatagaa aggagtgagc 23160  
agattctaca actttctaag aggcagaatc ataagtactg ggtgattaac tgggtatggg 23220  
gacaaggcaa aagaaagaag aaaagaggaa ggaggcgccc ttcattttaa taagaactac 23280  
agtgggagag cttctggttt caaggaaagt gacaaattca gttttggatg tgctgtattt 23340  
gatgtcctcc tatgaaacaa ccagtttaga aatctagctg tcaaatagac ctatggatct 23400  
gagcccagta aagaggcttg ggctccacat atggatttgg gaatcattag tatacagagg 23460  
ttgttgtggt taaacagcaa ctggtataga gtgagacatg agagatgagg acagaaatat 23520  
ggagaagaca aacatataaa ggaagaaggg gaataaccag caatgagtta gaagaagtga 23580  
ccagagaagc agaaggagaa ccaaagccat aaaaggtcac agaagccaaa gagcagccac 23640  
aggggagatc accccatggg taggcgaaag ctggcattag gactccagca catcagcaaa 23700  
gcttggctctt gtggcacccc caacttggag aaacaatact tggaggaaaa tgtgctattt 23760  
caaagaaagc atccttagaa aaaaccaggc caatgttgaa ctttcttaca tgtactaagt 23820  
ttttaagtac acacttggaa ggaagtgcc atcatctctt cagatgtgag aggctccagc 23880  
gtcctagtct ggtcatgagt gcgcaactct atggaaggct tctggggagt caaggaagat 23940  
gaaacctaaa tatgccatt ggatgtagga gcaaggaggg cattagagac attgatgaaa 24000  
gcattttcag gagatggagt gagcagtcag agcacattgg gaggaagtag agactgcaaa 24060  
ggcagacaac tcttgatggt gaggaagatg agaaagcaag aaaagaaaga aaggagcata 24120  
ggggaggggc acaggggaag agacttgagc gtgcttaatg cagggtggaag gaagcaggta 24180  
gagagtagga gatttcatat gaaagagaca gtttctcttg ccctgcattg taggaaggaa 24240  
ggggcacact gaagttcagc cccagtgatc agctatttaa catctctgag cctctgcttc 24300  
tgtaaaatga gaaccataag cctactgttg tggggattac aggtaacaga tggaaagaac 24360  
tcagccagaa gcttcagagt cactctcatg gcttgtcatg ttgatgttct ttctaattt 24420  
atgtgtttct cagtaaatta aatagttaga gataggtgtg gactgagga agacaggagg 24480  
ataaggggt atttgcacc tgagaatttg tgatgtccat tttgattcat gacttggcaa 24540  
taactcaggt atttttgttc ttcaccagca acacattaca tttggtctctt accacaaaa 24600  
cggaggtgat cccacctctc attgagaaca ggagtcctg gtcagtttgc aagcaagtct 24660  
ttcctggcct gaattactgc acctcaggcg cttactcaa cgccagctcc acagactccg 24720  
cctcacta tccgctgacc ggggacacca ggttagagat gctcagtgcc tgaccagca 24780  
ttttctcacc ttccacatca tggccaccta gcatggcaca ggaaaaaata ctctgtgttg 24840

ES 2 417 879 T3

taagaccctg tctactagcct tctgggtttg caccatcttt gggatattta agcagggtcc 24900  
 tctggccaac acattgggtg tcaccttttg cttccttctg catgggatgg gatcacagca 24960  
 cagatcccaa tttgctccta attcagtgtc catgtttctg agcctccaga cccatcgcta 25020  
 tgagcttcct ggagcccacc aatgtgcttg aagccttcac cgtacttagg tggctccctg 25080  
 tcttcagccc ccaagttcca gtgcttgctc tcagctttgc tgaacaacc agccaactcc 25140  
 tgctctgctt gtccaaagtc ttgggaatcc tgggtctctg ccttgccttg ggttcttgta 25200  
 ggactgaggg atcaaaaaga tcatcttagt taagggcaag agacaatggt aaaataagga 25260  
 ccatattttt gttgcatttg aggctgaatt gttttgggaa cataatcacc atccttgaaa 25320  
 gctctaacaat tatgactgtt cttcattgta atgtctttag attagagctg gaactgaggc 25380  
 ctacaggaga gattgagcag tattctgtca gcgcaaccta tgagctccag agagaggaca 25440  
 gagccttggg ggataccctg aagtttgtaa ctcaagcaga aggtgagtat tcaaaacaca 25500  
 gctgcctcat ctctgctctg agtctcaggt tcagaattca tgaggagaag acatgtaatt 25560  
 taacctattt acaaataggt ttaactgagt acccactaag cggcaggcct attctaagac 25620  
 ctgggttaac tgagtaccca ataagcggca ggctattctt aagacctggg gctagaacag 25680  
 tgaacaatgg agtctctgcc ttcatggaag ttacagtga caaccaacaca agttaatatt 25740  
 tggaatatca gataagtact gaggaggaaa acagagcgta gactggtcta tggagggcta 25800  
 ggagtaggag ggaggaagaa gggcagggaa agcagtgcat ttggaataat aagggaaagt 25860  
 ctccctggta aagtgagcat aaggagacct atcagaaata agaggagaag cctgttggtta 25920  
 agactgttaa caggcagagg gaccagcaag tgcaaggcc ctgaggctga cacactacta 25980  
 ccatgtttca aggaaaggaa ggaagacagt atggctggag cagaaagacc agggagaaaa 26040  
 gaggtagaag atgaggacag agagatatgg agaggtgaag gaaggataat ctcataggcc 26100  
 atggtaagaa ctttggcttt ttctatgaat taaacgaaag ccattgggga gtcctcatga 26160  
 tttgatttat gtttatgttg agaaaagact atgggcagac aagggcagag aaactaatat 26220  
 gtaggttatc acaataatcc aggcaggaat cagtgttgtt ttggatcagg gcaatggcag 26280  
 aagagatatg agaaggggat ggattctggc catattttga agattaggct gacaagattt 26340  
 gctgatacag tggatgttga gtgtaagagg aaaaggggaa tgaagacaaa cctaaggttt 26400  
 ttggcccggg caactgaaaa atggaacttc catttattga gatggaagg gctactggag 26460  
 gagcaggttt tagggaatgg gagaaattta ggtgttact ttggaaaaa aattatatag 26520  
 ggatagcgag gagcaggttt tagggaatgg ggcacattta ggtgttact ttggaaaaa 26580  
 ttttatatag ggatagcata tcacagaatt aaactaggaa gaaaatccca tgatagaaag 26640  
 cactggagga gcagggcacg ctggggaaat agtgtttggt aaacattggt ttacgaagga 26700  
 tataaatgg accagcctat ggattgaagg acgcccggga atcttgttac aaagaaaggg 26760  
 ggagttgggg agatggagcc cagggcaagg gcagcaagga accaggacag gcatcttggg 26820  
 tagaaagtaa tatagagatg tcgtgtcttc ctggccaga agggctgcca gcctttgctg 26880  
 ttccacaaac aagctaagtg ctccccattt cagggccttt gcattctga ccttctgcct 26940  
 ggaatgtgct cctcccagaa ctacagctgg ctccaacctc ttttcattct ggtctctgct 27000

## ES 2 417 879 T3

cacatgtgcc cttatcagag agaatttctc tgaccaccaa gtatgaaata acacttcttc 27060  
tatcccttcc ttttaccctt gtatccagtt ttactcttct tcataacatt cattaccatc 27120  
tgacatgagc aagttacttg tttattgcct gtacacctcc cccactagaa ggtaagcccc 27180  
atgaaagcaa ggattcccca gtaccaagag cagtgccag cacacaatag gctcataaca 27240  
ggcaatccat aaagacttgc atacatgaac acaactgagt ttaaaattat cagtaaatga 27300  
gaccattaa aaaattttaa tgagaaaaaa aaaattcagt aaaatcctga actgtgtttt 27360  
tgtttaagca cattgattcc ttggagtctc tctacctttt cctctctttc cttccaaaac 27420  
atagcttctt tatttattta tttatttatt tgtttgttta tttatttatt tatttattta 27480  
tttatttttt gagatggagt ctgctctttt tgcccaggct gcagtgagc ggtgccatct 27540  
cggctcactg caagccccgc ctcccgggtt catgccattc tcctgcctca gcctcctgag 27600  
tagctgggac tacaggcacc caccaacgcg cccggctaata tttttgtatt ttttagtagag 27660  
acggggtttc accatgtag ccagaatggt cttgatctcc tgacctcatg atctgcccgc 27720  
cttgccctcc caaagtgctg ggattacagg tgtgagccac cgcacccggc ccaaaacata 27780  
gcttcttacc acacatctct tgattctctt atacactcgt ccagggtgca agcagactga 27840  
ggctaccatg acattcaaat ataatcggca gagtatgacc ttgtccagtg aagtccaaat 27900  
tccggatfff gatgttgacc tcggaacaat cctcagagtt aatgatgaat ctactgaggg 27960  
caaacgtct tacagactca ccctggacat tcagaacaag aaaattactg aggtcgccct 28020  
catgggccac ctaaggtaaa gaaggccgag ggtcatctga cctgcaactgc aggcctgggt 28080  
ggttcttttc attattcctc ttccacttca tacctgacca agccatgttc tcccctagtc 28140  
tacaatcaga gtggcagaga gagccctcaa caattttttt ttttttgag atggagtctc 28200  
actctgtcac caggctggag tgcagtggca caatctggc tcaactgcaac ctccgcctcc 28260  
cgagtcaag tgattctcct gcttaagcct cccaaggagc tggaaactata ggtgcatgcc 28320  
accacacca gctaattttt atatttttag tagagacagg gtttcacat attgaccagg 28380  
atggtctcga tctcctgacc tcgtgatcca cctgccttgg cctcccaaag tgctgggatt 28440  
acaggtgtaa gccactgcac ccggccaagc tctcaacatt ttaaccctct gcgcatgtcc 28500  
agttggattt tcctaccatt tatcaggcac ttactattca tgtatcaagc acagtgtctg 28560  
gtgctttaa gaaattatct cggtcctcac aataaactgc gaggtcactg tgagttttcc 28620  
tgtttcatgg ataaggaaat ggtagctcag aggggttaa tcatttggc aaaatcacag 28680  
agctagtaa tagcagagca ggattcaaac agttttcaaa aaacttctct ttctcctaaa 28740  
cctgtttgca aagtccttaa tttgtgctga atgttggctt tagaagttga tgagtttgat 28800  
ctgtggctgt ttctctgaac catccttgta tctggttttg atcaccacaa atggaacttc 28860  
tgtttaatcc tgcatatctc cattgaaagg acaaaatcat tggtgccaac tgattttctt 28920  
taccatagtt gtgacacaaa ggaagaaaga aaaatcaagg gtgttatttc cataccccgt 28980  
ttgcaagcag aagccagaag tgagatcctc gccactggg cgctgcca actgcttctc 29040  
caaatggact catctgtac agcttatggc tccacagttt ccaagagggt ggcattggcat 29100

ES 2 417 879 T3

tatggtatgt gtctcttccc ctgtgtgagc acttccaaag taatgcaggt gttgagacct 29160  
 gtggttacag gctgaactag taccattcac aactatttcc tacgtatfff cagatgaaga 29220  
 gaagattgaa tttgaatgga acacaggcac caatgtagat accaaaaaaa tgacttccaa 29280  
 tttccctgtg gatctctccg attatcctaa gagcttgcat atgtatgcta atagactcct 29340  
 ggatcacaga gtccctcaaa cagacatgac tttccggcac gtgggttcca aattaatagt 29400  
 tgtaagtatg agtctgccag tcaataaata catggatata agtgctaatt acatcctcaa 29460  
 ctctgagcta ggtgcaggaa ggtttccaaa gatgtataag gcatgcttcc ttccccccag 29520  
 ggaattcttg gggagaaaaa aaaactttca caagtgtgta gttaccagct tacacaaagc 29580  
 tgaatgtgat acatatcaaa gagatgctac taagtagaac agttctttgc ctagtggat 29640  
 caaaggaagc ttcaggacac cagctaggag gctgactatg ttagacattc cttttataaa 29700  
 tatggacagt gatcagtgac tggcaacgaa gattcataat tttctgttat ttatttttaa 29760  
 ctttcagtg c attgtccagc ttaataatta acttgtcaaa tcggtatfff tgcctaattg 29820  
 tcattgtctt ttgaggctca tccaagccca ttaccttaa aatctcctgt cattttgtag 29880  
 gcaatgagct catggcttca gaaggcatct gggagtctt cttataccca gactttgcaa 29940  
 gaccacctca atagcctgaa ggagtcaac ctccagaaca tgggattgcc agacttccac 30000  
 atcccagaaa acctcttctt aaaaaggtaa aagaagaaag cagcaaggct tcttgaacca 30060  
 tgcaaagtaa atgaaagatt ttacatagca tgatttagac attttttaa atttttaaag 30120  
 gaaataatft aagcatttta aggagattaa taactatagc acaaacactg tggcatctft 30180  
 gcattagtaa acatgagaac accaaccctg tcaggaagaa tctaagaaag tcattagagg 30240  
 attctggtac tttcaccta agatatttta ttcagtacaa cctgttataa gcaaattctc 30300  
 cctctgactg tgaagaattc agaatggcta gaggcgttat tgactacagg cttgctgta 30360  
 agctagagag agtcagaaca gccattgagc actaaatgga ggcagattc tgagaaaata 30420  
 ctttaaccca ggcttactga cttccatacc tatgttcttt ccacaaatca agttgtctca 30480  
 attcagttta gcaaatttgt atcaagtatc ccctatgtgc aaaatgctag actaggtaca 30540  
 gtgagaagat agaaactggg taaggtatag cttttcttt caagaagata ccatggagac 30600  
 atcaacaaat gagaaataat taattatata agcaaaatta tgacatgctc tttgagaaag 30660  
 gtgcaagga ctatgtaact gtaagaatga gacaaattgg ctatgactta ggtgggatgg 30720  
 taatgataag gagtggcct tagaagagct ttgtcaggat ttgagtgttt gacaggtgga 30780  
 ggtaaaagca aaggggtcca ggcataggag tagcacaag aaaagtgcag agtggctttg 30840  
 ggaatggggc aagtacaata ttgttgtaa ggtcagaggc agagaacttt gaatgactga 30900  
 tgtctgactg tggggatgtt atctttgttg ttcatttcag cgatggccgg gtcaaatata 30960  
 ccttgaacaa gaacagtttg aaaattgaga ttcctttgcc ttttggggc aaatcctcca 31020  
 gagatctaaa gatgttagag actgttagga caccagcct ccacttcaag tctgtgggat 31080  
 tccatctgcc atctcgagag ttccaagtcc ctacttttac cattcccaag ttgtatcaac 31140  
 tgcaagtgcc tctcctgggt gttctagacc tctccacgaa tgtctacagc aacttgtaca 31200  
 actggtccgc ctctacagt ggtggcaaca ccagcacaga ccatttcagc cttcgggctc 31260

ES 2 417 879 T3

gttaccacat gaaggctgac tctgtggttg acctgctttc ctacaatgtg caaggtgagc 31320  
 tatgctcagg taaaggggtgc accgggctag ttcattggcag gctctaagag gagagcctcc 31380  
 tccagggagg aaaggacttt ggctttctag cagataatct tccttgctac ttggaagtct 31440  
 tttatTTTTat tcaacaaata gaaatattta ttaaacatat cacgtgtatt aaatattcta 31500  
 gtaggcagta acagaaagta gacagataag ccagcaatta taattcagtg tgagagggtgc 31560  
 tatgataaag tgtagtatat aagtataagg tagagtggaa gcaactcaaca agggaaccta 31620  
 aacaaagcct gtggtggtca ggcaaggctt cctggaggaa tgccttttgc tatlcatgtt 31680  
 tatctttgca ttacagatgg aggagtctat tgcacaattg gccagaaaa atggggcttt 31740  
 attattgaaa gactttcaac atagagattg ctctggaaat gtactgctta atttaaccaa 31800  
 tgtcttttca tttttatggt aggatctgga gaaacaacat atgaccacaa gaatacgttc 31860  
 acactatcat atgatgggtc tctacgccac aaatttctag attcgaatat caaattcagt 31920  
 catgtagaaa aacttgaaa caaccagtc tcaaaagggt tactaatatt cgatgcatct 31980  
 agttcctggg gaccacagat gtctgcttca gttcatttgg actccaaaa gaaacagcat 32040  
 ttgtttgca aagaagtcaa gattgatggg cagttcagag tctcttcggt ctatgctaaa 32100  
 ggcacatatg gcctgtcttg tcagagggat cctaactctg gccggctcaa tggagagtcc 32160  
 aacctgaggt ttaactctc ctacctcaa ggaccaacc agataacagg aagatatgaa 32220  
 gatggaacc tctccctcac ctccacctct gatctgcaaa gtggcatcat taaaaact 32280  
 gcttccttaa agtatgagaa ctacgagctg actttaaaat ctgacaccaa tgggaagtat 32340  
 aagaactttg ccacttctaa caagatggat atgaccttct ctaagcaaaa tgcactgctg 32400  
 cgttctgaat atcaggctga ttacgagtca ttgaggttct tcagcctgct ttctggatca 32460  
 ctaaattccc atggtcttga gttaaagtct gacatcttag gcaactgcaa aattaatagt 32520  
 ggtgctcaca aggcgacact aaggattggc caagatggaa tatctaccag tgcaacgacc 32580  
 aactgaagt gtagtctcct ggtgctggag aatgagctga atgcagagct tggcctctct 32640  
 ggggcatcta tgaaattaac aacaaatggc cgcttcaggg aacacaatgc aaaattcagt 32700  
 ctggatggga aagccgccct cacagagcta tcaactggaa gtgcttatca ggccatgatt 32760  
 ctgggtgtcg acagcaaaaa cattttcaac ttcaaggcca gtcaagaagg acttaagctc 32820  
 tcaaatgaca tgatgggctc atatgtgaa atgaaatttg accacacaaa cagtctgaac 32880  
 attgcaggct tatcaactgga cttctcttca aaacttgaca acatttacag ctctgacaag 32940  
 tttataagc aaactgttaa tttacagcta cagccctatt ctctggtaac tactttaac 33000  
 agtgacctga aatacaatgc tctggatctc accaacaatg ggaaactacg gctagaacct 33060  
 ctgaagctgc atgtggctgg taacctaaaa ggagcctacc aaaataatga aataaacac 33120  
 atctatgcca tctcttctgc tgccttatca gcaagctata aagcagacac tggtagtaag 33180  
 gttcaggggtg tggagtttag ccatcggtc aacacagaca tcgctgggct ggcttcagcc 33240  
 attgacatga gcacaaacta taattcagac tcaactgatt tcagcaatgt cttccgttct 33300  
 gtaatggccc cgtttaccat gaccatcgat gcacatacaa atggcaatgg gaaactcgtc 33360



ES 2 417 879 T3

ctctggggag aacatactgg gcagctgtat agcaaattcc tgttgaaagc agaacctctg 33420  
 gcatttactt tctctcatga ttacaaaggc tccacaagtc atcatctcgt gtctaggaaa 33480  
 agcatcagtg cagctcttga acacaaagtc agtgcctcgc ttactccagc tgagcagaca 33540  
 ggacacctga aactcaagac ccaatttaac aacaatgaat acagccagga cttggatgct 33600  
 tacaacacta aagataaaat tggcgtggag cttactggac gaactctggc tgacctaaact 33660  
 ctactagact cccaattaa agtgccactt ttactcagtg agcccatcaa tatcattgat 33720  
 gctttagaga tgagagatgc cgttgagaag cccaagaat ttacaattgt tgcttttga 33780  
 aagtatgata aaaaccaaga tgttctctcc attaacctcc cttttttga gaccttgcaa 33840  
 gaatattttg agaggaatcg acaaaccatt atagttgtac tggaaaacgt acagagaaac 33900  
 ctgaagcaca tcaatattga tcaatttgta agaaaataca gagcagccct gggaaaactc 33960  
 ccacagcaag ctaatgatta tctgaattca ttcaattggg agagacaagt ttcacatgcc 34020  
 aaggagaaac tgactgctct cacaaaaaag tatagaatta cagaaaatga tatacaaatt 34080  
 gcattagatg atgccaaaat caactttaat gaaaaactat ctcaactgca gacatatatg 34140  
 atacaatttg atcagtatat taaagatagt tatgatttac atgattgaa aatagctatt 34200  
 gctaataatta ttgatgaaat cattgaaaaa ttaaaaagtc ttgatgagca ctatcatatc 34260  
 cgtgtaaatt tagtaaaaac aatccatgat ctacatttgt ttattgaaaa tattgatttt 34320  
 aacaaaagtg gaagtagtac tgcacctctg attcaaaatg tggatactaa gtaccaaactc 34380  
 agaatccaga tacaagaaaa actgcagcag cttaaagagac acatacagaa tatagacatc 34440  
 cagcacctag ctggaaagtt aaaacaacac attgaggcta ttgatgttag agtgctttta 34500  
 gatcaattgg gaactacaat ttcatttgaa agaataaatg acattcttga gcatgtcaaa 34560  
 cactttgtta taaatcttat tggggatttt gaagtagctg agaaaatcaa tgccttcaga 34620  
 gccaaagtc atgagttaat cgagaggtat gaagtagacc aacaaatcca ggttttaatg 34680  
 gataaattag tagagttggc ccaccaatac aagttgaagg agactattca gaagctaagc 34740  
 aatgtcttac aacaagttaa gataaaagat tactttgaga aattggttgg atttattgat 34800  
 gatgctgtca agaagcttaa tgaattatct tttaaaacat tcattgaaga tgttaacaaa 34860  
 ttccttgaca tgttgataaa gaaattaaag tcatttgatt accaccagtt tgtagatgaa 34920  
 accaatgaca aaatccgtga ggtgactcag agactcaatg gtgaaattca ggctctggaa 34980  
 ctaccacaaa aagctgaagc attaaaactg tttttagagg aaaccaaggc cacagttgca 35040  
 gtgtatctgg aaagcctaca ggacaccaa ataaccttaa tcatcaattg gttacaggag 35100  
 gctttaagtt cagcatcttt ggctcacatg aaggccaaat tccgagagac cctagaagat 35160  
 acacgagacc gaatgtatca aatggacatt cagcaggaac ttcaacgata cctgtctctg 35220  
 gtaggccagg tttatagcac acttgtcacc tacatttctg attggtggac tcttgctgct 35280  
 aagaacctta ctgactttgc agagcaatat tctatccaag attgggctaa acgtatgaaa 35340  
 gcattggtag agcaagggtt cactgttcct gaaatcaaga ccatccttgg gaccatgcct 35400  
 gcctttgaag tcagtcttca ggctcttcag aaagctacct tccagacacc tgattttata 35460  
 gtccccctaa cagatttgag gattccatca gttcagataa acttcaaaga cttaaaaaat 35520

ES 2 417 879 T3

ataaaaaatcc catccagggtt ttccacacca gaattttacca tccttaacac cttccacatt 35580  
ccttccttta caattgactt tgtagaaatg aaagtaaaga tcatcagaac cattgaccag 35640  
atgctgaaca gtgagctgca gtggcccgtt ccagatatat atctcagga tctgaagggtg 35700  
gaggacattc ctctagcgag aatcacccctg ccagacttcc gtttaccaga aatcgcaatt 35760  
ccagaattca taatcccaac tctcaacctt aatgattttc aagttcctga ctttcacata 35820  
ccagaattcc agcttcccca catctcacac acaattgaag tacctacttt tggcaagcta 35880  
tacagtattc tgaaaatcca atctcctctt ttcacattag atgcaaatgc tgacataggg 35940  
aatggaacca cctcagcaaa cgaagcagggt atcgcagctt ccatcactgc caaaggagag 36000  
tccaaattag aagttctcaa ttttgatttt caagcaaatg cacaactctc aaaccctaag 36060  
attaatccgc tggctctgaa ggagtcagtg aagttctcca gcaagtacct gagaacggag 36120  
catgggagtg aaatgctggt ttttgaaat gctattgagg gaaaatcaaa cacagtggca 36180  
agtttacaca cagaaaaaaa taaactggag cttagtaatg gaggattgt caagataaac 36240  
aatcagctta ccctggatag caaactaaa tacttccaca aattgaacat ccccaaactg 36300  
gacttctcta gtcaggctga cctgcgcaac gagatcaaga cactgttgaa agctggccac 36360  
atagcatgga cttcttctgg aaaaggggtca tggaaatggg cctgccccag attctcagat 36420  
gagggaaacac atgaatcaca aattagtttc accatagaag gaccctcac ttcctttgga 36480  
ctgtccaata agatcaatag caaacaccta agagtaaacc aaaacttgggt ttatgaatct 36540  
ggctccctca acttttctaa acttgaaatt caatcacaag tcgattccca gcatgtgggc 36600  
cacagtgttc taactgctaa aggcattggca ctgtttgagg aaggaaggc agagtttact 36660  
gggaggcatg atgctcattt aaatggaaag gttattggaa ctttgaaaaa ttctcttttc 36720  
ttttcagccc agccatttga gatcacggca tccacaaaca atgaagggaa tttgaaagtt 36780  
cgttttccat taaggttaac aggaagata gacttctga ataactatgc actgtttctg 36840  
agtcccagtg cccagcaagc aagttggcaa gtaagtgcta ggttcaatca gtataagtac 36900  
aaccaaaatt tctctgctgg aaacaacgag aacattatgg aggccatgt aggaataaat 36960  
ggagaagcaa atctggattt cttaaactt ctttaacaa ttcctgaaat gcgcttacct 37020  
tacacaataa tcacaactcc tccactgaaa gatttctctc tatgggaaaa aacaggcttg 37080  
aaggaattct tgaaaacgac aaagcaatca tttgatttaa gtgtaaaagc tcagtataag 37140  
aaaaacaaac acaggcattc catcacaat ctttggtgctg tgctttgtga gtttatcagt 37200  
cagagcatca aatcctttga caggcatttt gaaaaaaaca gaaacaatgc attagatttt 37260  
gtcaccaaat cctataatga aacaaaaatt aagtttgata agtacaagc tgaaaaatct 37320  
cacgacgagc tcccaggac ctttcaaatt cctggataca ctgttccagt tgtcaatggt 37380  
gaagtgtctc cattcaccat agagatgtcg gcattcggct atgtgttccc aaaagcagtc 37440  
agcatgccta gtttctccat cctaggttct gacgtccgtg tgccttcata cacattaatc 37500  
ctgcatcat tagagctgcc agtccttcat gtcctagaa atctcaagct ttctcttcca 37560  
gatttcaagg aattgtgtac cataagccat atttttattc ctgcatggg caatattacc 37620  
tatgatttct cttttaaact aagtgtcatc aactgaata ccaatgctga actttttaac 37680

ES 2 417 879 T3

cagtcagata ttgttgctca ttcctttct tcatcttcat ctgtcattga tgcactgcag 37740  
 tacaattag agggcaccac aagattgaca agaaaaagg gattgaagtt agccacagct 37800  
 ctgtctctga gcaacaaatt tgtggagggt agtcataaca gtactgtgag cttaaccacg 37860  
 aaaaatatgg aagtgtcagt ggcaacaacc acaaaagccc aaattccaat tttgagaatg 37920  
 aatttcaagc aagaacttaa tggaaatacc aagtcaaac ctactgtctc ttcctccatg 37980  
 gaatttaagt atgatttcaa ttcttcaatg ctgtactcta ccgctaaagg agcagttgac 38040  
 cacaagctta gcttgaaag cctcacctct tacttttcca ttgagtcac taccaaagga 38100  
 gatgtcaagg gttcggttct ttctcgggaa tattcaggaa ctattgctag tgaggccaac 38160  
 acttacttga attccaagag cacacggctct tcagtgaagc tgcagggcac ttccaaaatt 38220  
 gatgatattc ggaaccttga agtaaaagaa aattttgctg gagaagccac actccaacgc 38280  
 atatattccc tctgggagca cagtacgaaa aaccacttac agctagaggg cctctttttc 38340  
 accaacggag aacatacaag caaagccacc ctggaactct ctccatggca aatgtcagct 38400  
 cttgttcagg tccatgcaag tcagcccagt tccttccatg atttccctga ccttggccag 38460  
 gaagtggccc tgaatgctaa cactaagaac cagaagatca gatggaaaa tgaagtccgg 38520  
 attcattctg ggtctttcca gagccaggtc gagctttcca atgaccaaga aaaggcacac 38580  
 cttgacattg caggatcctt agaaggacac ctaagggtcc tcaaaaatat catcctacca 38640  
 gtctatgaca agagcttatg ggatttccta aagctggatg taaccaccag cattggtagg 38700  
 agacagcatc ttcgtgtttc aactgccttt gtgtacacca aaaacccca tggctattca 38760  
 ttctccatcc ctgtaaaagt tttggctgat aaattcatta ttctgggct gaaactaat 38820  
 gatctaaatt cagttcttgt catgcctacg ttccatgtcc catttacaga tcttcaggtt 38880  
 ccatcgtgca aacttgactt cagagaaata caaatctata agaagctgag aacttcatca 38940  
 tttgccctca acctaccaac actccccgag gtaaaattcc ctgaagttga tgtgttaaca 39000  
 aatattctc aaccagaaga ctcttgatt cccttttttg agataaccgt gcctgaatct 39060  
 cagttaactg tgtcccagtt cacgcttcca aaaagtgtt cagatggcat tgctgctttg 39120  
 gatctaaatg cagtagccaa caagatcgca gactttgagt tgcccacat catcgtgcct 39180  
 gagcagacca ttgagattcc ctccattaag ttctctgtac ctgctggaat tgcattcct 39240  
 tccttcaag cactgactgc acgctttgag gtagactctc ccgtgtataa tgccacttg 39300  
 agtgccagtt tgaaaaacaa agcagattat gttgaaacag tcctggattc cacatgcagc 39360  
 tcaaccgtac agttcctaga atatgaacta aatggtaaga aatatcctgc ctctctcct 39420  
 agatactgta tattttcaat gagagttatg agtaaataat tatgtattta gttgtgagta 39480  
 gatgtacaat tactcaatgt cacaaaattt taagtaagaa aagagataca tgtataccct 39540  
 acacgtaaaa accaaactgt agaaaatcta gtgtcattca agacaaacag ctttaaagaa 39600  
 aatggatttt tctgtaatta ttttaggact aacaatgtct ttttaactatt tattttaaaa 39660  
 taagtgtgag ctgtacattg catattttaa acacaagtga aatatctggt taggatagaa 39720  
 ttctcccagt tttcacaatg aaaacatcaa cgtcctactg ttatgaatct aataaaatac 39780

ES 2 417 879 T3

aaaatctctc ctatacagtt ttgggaacac acaaaatcga agatggtacg ttagcctcta 39840  
 agactaaagg aacatttgca caccgtgact tcagtgcaga atatgaagaa gatggcaaat 39900  
 atgaaggact tcagtatgga gcttttattg aattgaaacc ttataccttt tgaaaactca 39960  
 ttgtgatttt cttcatctcc ataccctttt cgtgatagct catctgtttt tctgctttca 40020  
 gggaatggga aggaaaagcg cacctcaata tcaaaagccc agcgttcacc gatctccatc 40080  
 tgcgctacca gaaagacaag aaaggcatct ccacctcagc agcctcccca gccgtaggca 40140  
 ccgtgggcat ggatatggat gaagatgacg acttttctaa atggaacttc tactacagcc 40200  
 ctcaggtaaa taccacctaa tgagtgacac gcccccaaga gcgagtggag aattggggca 40260  
 gatacattta attcaggacc ~~aaatattcag~~ agattcccca aactagggtga aagacaggcg 40320  
 gtaagcaact tcttctctga ggaaatattc tctagaaagt attacaatga gtccttgatt 40380  
 gattttaatg tttagatgca cacatgacat cccatcagca ctattattta ttaattctg 40440  
 gcaaatccag gaagatgagg gttatacctc atcatctaaa tcataggcaa gctcagccat 40500  
 aggcagggta tatttttcag agaggactgg tttctgtagt atttaaaact ttaaaattct 40560  
 tccccacaat agaattgcta gatgagatac atcaaattcc tctcatgtca ttacaagct 40620  
 ctgccagggc caaatcaagg gtgacattac cagaggagaa gaccaaacat ggttctatga 40680  
 ctgttactaa aagtttgta tgggcttggg gaatgcgtac tgatgttggg attctgggtc 40740  
 tctgcagggg gggctccaac ttgccttttt tgctatttct tcttttccta tctgtcattt 40800  
 cctgactctt cttctctctc ctcttctttc tcttcccccc actcctcttc cagttttcag 40860  
 tcctaggaag gctttaattt taagtgtcac aatgtaaagt acaaacagca agcgtttttg 40920  
 ttaaactcct tctggggcat gtgataaaga gaaattaaca acagtagact tatttaacca 40980  
 taaaacaaac acatgaactg acatatgaaa gataaatccc tttcagtata tgaagattc 41040  
 tctgatcttt atttttaact gctaataag ttttagtgta ctatattgtg taattggagt 41100  
 aattgaaaac atgttatttt ttttttctc tctgtttagt cctctccaga taaaaaactc 41160  
 accatattca aaactgagtt gagggccgg gaatctgatg aggaaactca gatcaaagt 41220  
 aattgggaag aagaggcagc ttctggcttg ctaacctctc tgaaagacaa cgtgcccaag 41280  
 gccacagggg tcctttatga ttatgtcaac aagtaccact gggaacacac agggctcacc 41340  
 ctgagagaag tgtcttcaaa gctgagaaga aatctgcaga acaatgctga gtgggtttat 41400  
 caaggggcca ttaggcaaat tgatgatatc gacgtgaggt tccagaaagc agccagtggc 41460  
 accactggga cctaccaaga gtggaaggac aaggcccaga atctgtacca ggaactgttg 41520  
 actcaggaag gcccaagccag tttccagggg ctcaaggata acgtgtttga tggcttggt 41580  
 cgagttactc aagaattcca tatgaaagtc aagcatctga ttgactcact cattgatttt 41640  
 ctgaacttcc cgagattcca gtttccgggg aaacctggga tatacactag ggaggaactt 41700  
 tgcactatgt tcataagggg ggtagggacg gtactgtccc aggtatattc gaaagtccat 41760  
 aatggttcag aaatactggt ttcctatttc caagacctag tgattacact tcctttcgag 41820  
 ttaaggaaac ataaactaat agatgtaatc tcgatgtata gggaaactgtt gaaagattta 41880  
 tcaaaagaag cccaagaggt atttaaagcc attcagtctc tcaagaccac agaggtgcta 41940

ES 2 417 879 T3

cgtaatcttc aggacctttt acaattcatt ttccaactaa tagaagataa cattaaacag 42000  
ctgaaagaga tgaaatttac ttatcttatt aattatatcc aagatgagat caacacaatc 42060  
ttcagtgatt atatcccata tgtttttaaa ttgttgaaag aaaacctatg ccttaatctt 42120  
cataagttca atgaatttat tcaaacgag cttcaggaag cttctcaaga gttacagcag 42180  
atccatcaat acattatggc ccttcgtgaa gaatattttg atccaagtat agttggctgg 42240  
acagtgaaat attatgaact tgaagaaaag atagtcagtc tgatcaagaa cctgttagtt 42300  
gctcttaagg acttccattc tgaatatatt gtcagtgctt ctaactttac ttcccaactc 42360  
tcaagtcaag ttgagcaatt tctgcacaga aatattcagg aatatcttag catccttacc 42420  
gatccagatg gaaaagggaa agagaagatt gcagagcttt ctgccactgc tcaggaaata 42480  
attaagacc aggccattgc gacgaagaaa ataatttctg attaccacca gcagtttaga 42540  
tataaactgc aagatttttc agaccaactc tctgattact atgaaaaatt tattgctgaa 42600  
tccaaaagat tgattgacct gtccattcaa aactaccaca ctttctgat atacatcacg 42660  
gagttactga aaaagctgca atcaaccaca gtcatgaacc cctacatgaa gcttgctcca 42720  
ggagaactta ctatcatcct ctaatttttt aaaagaaatc ttcatttatt cttcttttcc 42780  
aattgaactt tcacatagca cagaaaaaat tcaaactgcc tatattgata aaaccataca 42840  
gtgagccagc cttgcagtag gcagtagact ataagcagaa gcacatatga actggacctg 42900  
caccaaagct ggcaccaggg ctcggaaggt ctctgaactc agaaggatgg cattttttgc 42960  
aagttaaaga aatcaggat ctgagttatt ttgctaaact tgggggagga ggaacaaata 43020  
aatggagtct ttattgtgta tcataccact gaatgtggct catttgtatt gaaagacagt 43080  
gaaacgaggg cattgataaa atgttctggc acagcaaac ctctagaaca catagtgtga 43140  
tttaagtaac agaataaaaa tggaaacgga gaaattatgg agggaaatat tttgcaaaaa 43200  
tatttaaaaa gatgaggtaa ttgtgttttt ataattaaat attttataat taaaatattt 43260  
ataattaaat tttttataat taaatatttt ataattaaat tttttataat taaatatttt 43320  
ataattaaag tttttataat taaatatttt ataattaaat tttttataat taaatatttt 43380  
ataattaaat tttttataat taaatatttt ataattaaat tttttataat taaatatttt 43440  
ataat 43445

<210> 335  
<211> 20  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 335

tctgtaagac aggagaaga 20

15 <210> 336  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 336

25 atttctctt ctgtaagaca 20

<210> 337  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 337  
 10 gatgccttac ttgacagac 20  
 <210> 338  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 20  
 <400> 338  
 agaatagct ctccaagga 20  
 25 <210> 339  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 339  
 35 gtcgcatctt ctaacgtggg 20  
 <210> 340  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 45 <400> 340  
 tctccatac cttgcagttg 20  
 <210> 341  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 55  
 \*<400> 341  
 tggctcatgt ctaccatatt 20  
 60  
 <210> 342  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 342

5 cagttgaaat gcagctaag 20  
 <210> 343  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 343

tcagactag gagtgaagt 20  
 <210> 344  
 20 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 25 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 344

30 aggaggatgt cctttattg 20  
 <210> 345  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 345

40 atcagagcac caaaggaat 20  
 <210> 346  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 50 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 346

ccagctcaac ctgagaattc 20  
 55 <210> 347  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 347

65 catgacttac ctggacatgg 20

<210> 348  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 348  
 10 cctcagcgga cacacacaca 20  
 <210> 349  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 20  
 <400> 349  
 gtcacatccg tgctgtgctc 20  
 25 <210> 350  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 350  
 35 cagtgcctct gggacccac 20  
 <210> 351  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 45 <400> 351  
 agctgcagtg gccgatcagc 20  
 <210> 352  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 55 <400> 352  
 gacctcccca gccacgtgga 20  
 60 <210> 353  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65 <220>



<223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 353

5 tctgatcacc atacattaca 20  
 <210> 354  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 354  
 atttcccact ggtactctc 20  
 <210> 355  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 355 20  
 ggctgaagcc catgctgact 20  
 <210> 356  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 356 20  
 gttggacagt cattctttg 20  
 <210> 357  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

45 <400> 357 20  
 cactgttgg acagtcattc 20  
 <210> 358  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

55 <400> 358  
 attttaaatt acagtagata 20

60  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

65 <400> 358

<210> 359  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 359  
 10 ctgttctcca cccatatcag 20  
 <210> 360  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 20  
 <400> 360  
 gagctcatac ctgtcccaga 20  
 25 <210> 361  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 361  
 35 ttcaagggcc actgctatca 20  
 <210> 362  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 45 <400> 362  
 ccagtatttc acgccaatcc 20  
 <210> 363  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 55 <400> 363  
 ggcaggagga acctcgggca 20  
 60 <210> 364  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 364

5 ttttaaaatt agaccaacc 20  
 <210> 365  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 365

tgactgtttt aaaattagac 20

20 <210> 366  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 366

30 cccagcaaac acaggtgaag 20  
 <210> 367  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 367

40 gagtgtggtc ttgctagtgc 20  
 <210> 368  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

50 <400> 368

ctatgcagag tgggtcctg 20

55 <210> 369  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 369

65 agaagatgca accacatgta 20

<210> 370  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 370  
 10  
 acacggtatc ctatggagga 20  
 <210> 371  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 20  
 <400> 371  
 tgggacttac catgccttgg 20  
 25  
 <210> 372  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 372  
 35  
 ggtttgctg ccctacatcc 20  
 <210> 373  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 45  
 <400> 373  
 acaaggagtc cttg'gcaga 20  
 <210> 374  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 374  
 55  
 atgttcactg agacaggctg 20  
 <210> 375  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60  
 <220>  
 65

<223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 375  
 5 gaaggtccat ggttcatctg 20  
 <210> 376  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 376  
 attagactgg aagcatcctg 20  
 <210> 377  
 20 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 377  
 gagattggag acgagcattt 20  
 30 <210> 378  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 378  
 40 catgacctac ttgtaggaga 20  
 <210> 379  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 50 <400> 379  
 tggatttggga tacacaagtt 20  
 55 <210> 380  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 380  
 65 actcaatata tattcattga 20

<210> 381  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 381  
 10  
 caaggaagca caccatgtca 20  
 <210> 382  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 20  
 <400> 382  
 atacttattc ctggtaacca 20  
 25  
 <210> 383  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 383  
 35  
 ggtagccaga acaccagtgt 20  
 <210> 384  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 45  
 <400> 384  
 actagaggta gccagaacac 20  
 50  
 <210> 385  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 385  
 60  
 accacctgac atcacaggtt 20  
 <210> 386  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 386

5 tactgtgacc tatgccagga 20  
 <210> 387  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 387  
 ggaggtgcta ctgtgacat 20  
 <210> 388  
 20 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 388

30 tccagacttg tctgagtcta 20  
 <210> 389  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 389

40 tctaagaggt agagctaaag 20  
 <210> 390  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

50 <400> 390  
 ccagagatga gcaacttagg 20  
 <210> 391  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 391

65 ggccatgtaa attgctcatc 20

<210> 392  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 392  
 10  
 aaagaaacta tctgtattc 20  
 <210> 393  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 20  
 <400> 393  
 ttcttagtac ctggaagatg 20  
 25  
 <210> 394  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 394  
 35  
 cattagatac ctggacacct 20  
 <210> 395  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 45  
 <400> 395  
 gttcatgga actcagcgca 20  
 50  
 <210> 396  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 396  
 60  
 ctggagagca cctgcaatag 20  
 <210> 397  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>



<223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 397  
 5 tgaaggtag agaatcata 20  
 <210> 398  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 398  
 gaaactcac ttgtgaccg 20  
 20 <210> 399  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 399  
 30 agtgcaaga tgtcctctg 20  
 <210> 400  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 400  
 tgcacagagg tgcaagatg 20  
 45 <210> 401  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 401  
 cacaagagta aggagcagag 20  
 55 <210> 402  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 402  
 65 gatggatggt gagaaattac 20

<210> 403  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 403  
  
 tagacaattg agactcagaa 20  
  
 <210> 404  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 404  
  
 atgtgcacac aaggacatag 20  
  
 25 <210> 405  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 405  
 35 acatacaaat ggcaataggc 20  
  
 <210> 406  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 406  
  
 taggcaaagg acatgaatag 20  
  
 50 <210> 407  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 407  
  
 60 ttatgatagc tacagaataa 20  
  
 <210> 408  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 408  
 5 ctgagattac ccgcagaatc 20  
 <210> 409  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 409  
 gatgtatgtc atataaaaga 20  
 20 <210> 410  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 410  
 30 tttccaatga cctgcattga 20  
 <210> 411  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 411  
 agggatggtc aatctggtag 20  
 45 <210> 412  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 412  
 ggctaataaa taggtagtt 20  
 55 <210> 413  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 413  
 65 tcctagagca ctatcaagta 20

<210> 414  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 414  
  
 cctcctggtc ctgcagtcaa 20  
  
 <210> 415  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 415  
  
 cattgcaca agtgttggt 20  
  
 25 <210> 416  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 416  
  
 35 ctgacacacc atgttattat 20  
  
 <210> 417  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 45 <400> 417  
  
 cttttcaga ctagataaga 20  
  
 50 <210> 418  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 418  
  
 60 tcacacttac ctcgatgagg 20  
  
 <210> 419  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 419  
 5 aagaaatgg catcaggtt 20  
 <210> 420  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 420  
 ccaagccaat ctgagaaaga 20  
 20 <210> 421  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 421  
 30 aaatacacac ctgctcatgt 20  
 <210> 422  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 422  
 cttcacaat acacacctgc 20  
 <210> 423  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 423  
 50 agtgaagtt tggctcatt 20  
 <210> 424  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 424  
 60 ttgctagctt caaagtgaa 20

<210> 425  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 425  
  
 tcaagaataa gctccagatc 20  
  
 <210> 426  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 426  
  
 gcatacaagt cacatgaggt 20  
  
 25 <210> 427  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 427  
  
 35 tacaaggtgt ttctaagaa 20  
  
 <210> 428  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 45 <400> 428  
  
 atgcagccag gatgggccta 20  
  
 50 <210> 429  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 429  
  
 60 ttaccatc ctgagagttt 20  
  
 <210> 430  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 430  
 5 gcaaaggtag aggaaggtat 20  
  
 <210> 431  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 431  
  
 aaggaccttc agcaaagga 20  
 20 <210> 432  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 432  
 30 cataggagta catttatata 20  
  
 <210> 433  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 433  
  
 attatgataa aatcaatttt 20  
  
 <210> 434  
 45 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 434  
  
 agaaattca ctgatagat 20  
 55 <210> 435  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 435  
 65 agcatatttt gatgagctga 20

<210> 436  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 436  
  
 gaaaggaagg actagcatat 20  
  
 <210> 437  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 437  
  
 cctctcaat ctgtagaccc 20  
  
 25 <210> 438  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 438  
  
 35 ctggataact cagaccttg 20  
  
 <210> 439  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 45 <400> 439  
  
 agtcagaaaa caacctattc 20  
  
 50 <210> 440  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 440  
  
 60 cagcctgcat ctataagtca 20  
  
 <210> 441  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial



<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 441  
 5 aaagaattac cctccactga 20  
 <210> 442  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 442  
 tcttcaaac tggctaggca 20  
 20 <210> 443  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 443  
 30 gcctggcaaa attctgcagg 20  
 <210> 444  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 444  
 ctacctcaaa tcaatagtt 20  
 45 <210> 445  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 445  
 55 tgctttacct acctagctac 20  
 <210> 446  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 446  
 65 accttggtgtg tctcactcaa 20

<210> 447  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 10 <400> 447  
  
 atgcattccc tgactagcac 20  
  
 <210> 448  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 448  
  
 catctctgag ccccttacca 20  
  
 25 <210> 449  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 449  
 35 gctgggcatg ctctctccc 20  
  
 <210> 450  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 45 <400> 450  
  
 gctttcgag ctgggcatgc 20  
  
 50 <210> 451  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 451  
 60 actccttct atacctggct 20  
  
 <210> 452  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 452  
 5 attctgcctc ttagaaagt 20  
 <210> 453  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 15 <400> 453  
 ccaagcctct ttactggct 20  
 20 <210> 454  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 454  
 30 cactcatgac cagactaaga 20  
 <210> 455  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 455  
 acctcccaga agcctccat 20  
 <210> 456  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 456  
 55 ttcatatgaa atctctact 20  
 <210> 457  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 457

tatttaattt actgagaaac 20  
 <210> 458  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 458  
 taatgtgtg ctggtgaaga 20  
 15 <210> 459  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 459  
 25 catctctaac ctggtgtccc 20  
 <210> 460  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 460  
 gtgccatgct agtggccat 20  
 40 <210> 461  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 461  
 50 agcaaattgg gatctgtgct 20  
 <210> 462  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 462  
 60 tctggaggct cagaaacatg 20  
 <210> 463  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 463  
 tgaagacagg gagccaccta 20  
 <210> 464  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 464  
 20 aggattcca agactttgga 20  
 <210> 465  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 465  
 30 cagctctaat ctaaagacat 20  
 <210> 466  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 466  
 gaatactcac cttctgctg 20  
 45 <210> 467  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 467  
 55 atctctctgt cctcatcttc 20  
 <210> 468  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 468

ccaactcccc ctttcttgt 20  
 <210> 469  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 469  
 tctggccag gaagacacga 20  
 15 <210> 470  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 470  
 25 tattgtgtgc tggcactgc 20  
 <210> 471  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 471  
 tgcttcgcac ctggcagagt 20  
 <210> 472  
 40 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 472  
 ccttcttac ctaggtggc 20  
 <210> 473  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 473  
 60 gctctctctg ccactctgat 20  
 <210> 474  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 474  
 aacttctaaa gccaacattc 20  
 <210> 475  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 475  
 20 tgggtcaca ctatggtaaa 20  
 <210> 476  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 476  
 30 agacacatac cataatgccca 20  
 <210> 477  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 40 <400> 477  
 ttcttctcat ctgaaaatac 20  
 45 <210> 478  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 478  
 55 tgaggatgta attagcact 20  
 <210> 479  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 479

agctcattgc ctacaaaatg 20  
 <210> 480  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 480  
 gttctcatgt ttactaatgc 20  
 15 <210> 481  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 481  
 25 gaattgagac aactgatt 20  
 <210> 482  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 482  
 ccggccatcg ctgaaatgaa 20  
 40 <210> 483  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 483  
 catagctcac cttgcacatt 20  
 50 <210> 484  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 484  
 60 cggcgcaccc ttacctgag 20  
 <210> 485  
 <211> 20  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial



<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 485  
 tctccagatc ctaacataaa 20  
 <210> 486  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 486  
 20 ttgaatgaca ctagatttc 20  
 <210> 487  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 487  
 30 aaaatccatt ttctttaaag 20  
 <210> 488  
 <211> 20  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 488  
 cagctcacac ttattttaa 20  
 45 <210> 489  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 489  
 55 gtcccaaaa ctgtatagga 20  
 <210> 490  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 65 <400> 490

agctccatac tgaagtcctt 20  
 <210> 491  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 10 <400> 491  
 caattcaata aaagctccat 20  
 15 <210> 492  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 492  
 25 gtttcaaaa ggtataaggt 20  
 <210> 493  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 35 <400> 493  
 ttccattcc ctgaaagcag 20  
 40 <210> 494  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 494  
 50 tggatttac ctgagggctg 20  
 <210> 495  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 60 <400> 495  
 ataaataata gtgctgatgg 20  
 65 <210> 496  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 496  
 ctatggctga gcttgctat 20  
 10 <210> 497  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 497  
 20 ctctctgaaa aatatacct 20  
 <210> 498  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30 <400> 498  
 ttgatgtatc tcatctagca 20  
 <210> 499  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 499  
 40 tagaacctatg ttggtcttc 20  
 <210> 500  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 50 <400> 500  
 ttctcttta tcacatgcc 20  
 <210> 501  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 60 <400> 500  
 ttctcttta tcacatgcc 20  
 <210> 501  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 501  
tatagtacac taaaactca 20

5 <210> 502  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 502

15 ctggagagga ctaaacagag 20

<210> 503  
<211> 568  
<212> ADN  
20 <213> H. sapiens

<220>  
<221> característica\_misc  
<222> 44, 99, 156, 468  
25 <223> n = A,T,C o G

<400> 503

ccaaaagatt gattgactgt ccattcaaag ctacacgcaa tttntgatat acatcacgta 60  
gttactgaaa aagctgcaat caacacagtt catggaccnc taccatgaag cttgctccag 120  
gagaacttct atcattcctc taatttttta aaaganatct tcattttattc ttcttttcca 180  
attgaacttt cacatagcac agaaaaaatt caaactgcct atattgataa aaccatacag 240  
tgagccagcc ttgcagtagg cagtagacta taagcagaag cacatatgaa ctggacctgc 300  
accaaagctg gcaccagggc tcggaaggtc tctgaactca gaaggatggc attttttgca 360  
agttaaagaa aatcaggatc tgagttatct tgctaaactt gggggaggag gaacaaataa 420  
atggagtctt tattgtgtat cataccactg aatgtggctc atttgtanta aaagacagtg 480  
aaacgagggc attgataaaa tgttctggca cagcaaaacc tctagaacac atagtgtgat 540  
30 ttaagtaaca gaataaaaat ggaacagg 568

<210> 504  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

35 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 504

40 acattttatc aatgccctcg 20

<210> 505  
<211> 20  
45 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

50 <400> 505

gccagaacat ttatcaatg 20

5 <210> 506  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 506

15 agaggtttg ctgtgccaga 20

<210> 507  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 507

25 ctagaggtt tgctgcca 20

<210> 508  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 508

tctagaggtt ttgctgtgcc 20

40 <210> 509  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 509

50 aatcacacta tegtcttag 20

<210> 510  
<211> 20  
<212> ADN

55 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

60 <400> 510

aaatcacact atgttcta 20

65 <210> 511  
<211> 20  
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 5 <400> 511  
 taaatcacac tatgtgttct 20  
 10 <210> 512  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 512  
 20 cttaaatacac actatgtgtt 20  
 <210> 513  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30 <400> 513  
 tattctgtta cttaaatacac 20  
 <210> 514  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 514  
 40 tggtagcctc agtctgcttc 20  
 <210> 515  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 515  
 50 agtctgcttc ggccttctg 20  
 <210> 516  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 55 <400> 516  
 60 ggcagggc cgaagaggaa 20  
 <210> 516  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 65 <400> 516  
 70 ggcagggc cgaagaggaa 20

<210> 517  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 5 <400> 517  
 caggatgag ctcaagctgg 20  
 10 <210> 518  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 15 <400> 518  
 catcctgaac atcaagaggg 20  
 20 <210> 519  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 25 <400> 519  
 gggcagtg atcgctcaa 20  
 30 <210> 520  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 520  
 35 cacttgctct catcaaaggc 20  
 <210> 521  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> H. sapiens  
 <400> 521  
 45 cacactggac gctaagagga 20  
 <210> 522  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 50 <400> 522  
 cgctgagcca cgcggtcaac 20  
 55 <210> 523  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 60 <400> 523  
 tgtccaaatt ctacatggg 20  
 65 <210> 524  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> H. sapiens  
 <400> 524  
 5 cagctgacct catcgagatt 20  
 <210> 525  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> H. sapiens  
 <400> 525  
 15 gtcaagtcc tgatggtgc 20  
 <210> 526  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> H. sapiens  
 <400> 526  
 agctgcttct gatgggtgcc 20  
 25 <210> 527  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 30 <400> 527  
 gggcatcatc attccggact 20  
 35 <210> 528  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 528  
 40 cctactatcc gctgaccggg 20  
 <210> 529  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 529  
 50 gggccaccta agtttgaca 20  
 <210> 530  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> H. sapiens  
 <400> 530  
 60 agaacatggg attgccagac 20  
 <210> 531  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> H. sapiens  
 <400> 531



	ctccactca agtctgtggg	20
5	<210> 532 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 532 cagagcttg cctctctggg	20
15	<210> 533 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 533 tggccgcttc agggaacaca	20
25	<210> 534 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 534 cagctgagca gacaggcacc	20
35	<210> 535 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 535 gggagagaca agttcacat	20
45	<210> 536 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 536 gtactgcatc ctggattcaa	20
55	<210> 537 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 537 gtgaggtgac tcagagactc	20
65	<210> 538 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
70	<400> 538 ttgcagagca atattctatc	20

	<210> 539	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
5	<400> 539	
	aagcattggt agagcaaggg	20
10	<210> 540	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
15	<400> 540	
	ccgctggctc tgaaggagtc	20
20	<210> 541	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
25	<400> 541	
	tctagtcagg ctgacctgcg	20
30	<210> 542	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
35	<400> 542	
	gggccacagt gttctaactg	20
40	<210> 543	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
45	<400> 543	
	aatcaagtgt catcacactg	20
50	<210> 544	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
55	<400> 544	
	gggtagtcat aacagtactg	20
60	<210> 545	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
65	<400> 545	
	agagcacacg gtcttcagtg	20
70	<210> 546	
	<211> 20	
	<212> ADN	

<213> H. sapiens  
 <400> 546  
 5 ttacagctag agggcctctt 20  
 <210> 547  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> H. sapiens  
 <400> 547  
 15 caccgtgggc atggatatgg 20  
 <210> 548  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> H. sapiens  
 <400> 548  
 gggaatctga tgaggaaact 20  
 25 <210> 549  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 30 <400> 549  
 tgtcaacaag taccactggg 20  
 <210> 550  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 35 <400> 550  
 40 acctgggata tacactaggg 20  
 <210> 551  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 45 <400> 551  
 50 ccaagtatag ttggctggac 20  
 <210> 552  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> H. sapiens  
 <400> 552  
 60 tacatgaagc ttgtccagg 20  
 <210> 553  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 65 <400> 553

ES 2 417 879 T3

	atgtcagcct ggtctgtcca	20
5	<210> 554 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 554 gcacctccgg aagtacacat	20
15	<210> 555 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 555 ctgcagcttc atcctgaaga	20
25	<210> 556 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 556 tgagggcaaa gccttgctga	20
35	<210> 557 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 557 ccattccaga agggaagcag	20
45	<210> 558 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 558 cgaggaagg caatgtggca	20
55	<210> 559 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 559 cctgtcaac tctgatcagc	20
65	<210> 560 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 560 agcagccagt cctgtcagta	20

<210> 561  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 5 <400> 561  
 agcatgtggc agaagccatc 20  
 10 <210> 562  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 15 <400> 562  
 gagagcacca aatccacatc 20  
 20 <210> 563  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 25 <400> 563  
 cctcagtgat gaagcagtca 20  
 30 <210> 564  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 35 <400> 564  
 gatagatgtg gtcacctacc 20  
 40 <210> 565  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 45 <400> 565  
 cctcagcaca gcagctgcga 20  
 50 <210> 566  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 55 <400> 566  
 gattctgcgg gtcattggaa 20  
 60 <210> 567  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 65 <400> 567  
 caaagccatc actgatgatc 20  
 <210> 568  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> H. sapiens  
 <400> 568  
 5 agaaagctgc catccaggct 20  
 <210> 569  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> H. sapiens  
 <400> 569  
 15 caggagggtc ttcttcagac 20  
 <210> 570  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> H. sapiens  
 <400> 570  
 gagtcctca caggcagata 20  
 25 <210> 571  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 30 <400> 571  
 tgccaatc ttgaactcag 20  
 <210> 572  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 35 <400> 572  
 40 catcgagatt ggcttgaag 20  
 <210> 573  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 45 <400> 573  
 50 ggagctggat tacagttgca 20  
 <210> 574  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> H. sapiens  
 <400> 574  
 60 caacatgcag gctgaactgg 20  
 <210> 575  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 65 <400> 575

	acattacatt tggctctac	20
5	<210> 576 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <400> 576	
10	ctcaggcgct tactccaacg	20
15	<210> 577 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <400> 577	
20	gggacaccag attagagctg	20
25	<210> 578 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <400> 578	
30	gagctccaga gagaggacag	20
35	<210> 579 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <400> 579	
40	atcggcagag tatgacctg	20
45	<210> 580 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <400> 580	
50	caaggtggtt attccatac	20
55	<210> 581 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <400> 581	
60	gactcatctg ctacagctta	20
65	<210> 582 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens  <400> 582	
70	gcaaatctc cagagatcta	20

<210> 583  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 5 <400> 583  
 ctctcctggg tgttctagac 20  
 10 <210> 584  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 15 <400> 584 20  
 atgaaggctg actctgtggt 20  
 20 <210> 585  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 25 <400> 585  
 gggaccacag atgtctgctt 20  
 30 <210> 586  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 586  
 35 ctggccggct caatggagag 20  
 <210> 587  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> H. sapiens  
 <400> 587  
 gctgcgttct gaatcagc 20  
 45 <210> 588  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 50 <400> 588  
 tgctgacatc ttaggcactg 20  
 55 <210> 589  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 60 <400> 589 20  
 aagtgtagtc tctgtgtct 20  
 65 <210> 590  
 <211> 20  
 <212> ADN



<213> H. sapiens  
 <400> 590 20  
 5 caaaattcag tctggatggg 20  
 <210> 591  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> H. sapiens  
 <400> 591  
 15 gggaaactac ggctagaacc 20  
 <210> 592  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> H. sapiens  
 <400> 592  
 ctgcatgtgg ctggtaacct 20  
 25 <210> 593  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 30 <400> 593  
 ccatgacat cgatgcacat 20  
 35 <210> 594  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 594  
 40 atgggaaact cgctctctgg 20  
 <210> 595  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 595  
 50 agtcatcatc tcgtgtctag 20  
 <210> 596  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> H. sapiens  
 <400> 596  
 60 gaatacagcc aggacttggg 20  
 <210> 597  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> H. sapiens  
 <400> 597

	ggcgtggagc ttactggacg	20
5	<210> 598 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 598 gagatgagag atgccgttga	20
15	<210> 599 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 599 agtcttgatg agcactatca	20
25	<210> 600 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 600 ctaagtacca aatcagaatc	20
35	<210> 601 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 601 gtccatgagt taatcgagag	20
45	<210> 602 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 602 aggccacagt tgcagtgat	20
55	<210> 603 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 603 tctgattggt ggactcttgc	20
65	<210> 604 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 604 gaagtcagtc ttcaggctct	20

<210> 605  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 5 <400> 605  
 ccagattctc agatgagga 20  
 10 <210> 606  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 15 <400> 606  
 catctgtcat tgatgcactg 20  
 20 <210> 607  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 25 <400> 607  
 aggagatgac aagggttcgg 20  
 30 <210> 608  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 35 <400> 608  
 ggaactattg ctagtgaggc 20  
 40 <210> 609  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 45 <400> 609  
 ctctctccat ggcaaatgac 20  
 50 <210> 610  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 55 <400> 610  
 caccgtgact tcagtcaga 20  
 60 <210> 611  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 65 <400> 611  
 actgagttga ggggccggga 20  
 <210> 612  
 <211> 20

ES 2 417 879 T3

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 612  
 5 cacatatgaa ctggacctgc 20  
 <210> 613  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 613  
 15 tctgaactca gaaggatggc 20  
 <210> 614  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> H. sapiens  
 <400> 614  
 25 ggtgcgaagc agactgaggc 20  
 <210> 615  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> H. sapiens  
 <400> 615  
 tcccaccggg acctcgggg 20  
 35 <210> 616  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 40 <400> 616 20  
 caccgggacc tgcggggctg 20  
 <210> 617  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 617  
 50 ctgagtgccc ttctcggtg 20  
 <210> 618  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> H. sapiens  
 <400> 618  
 60 ctcggttgct gccgctgagg 20  
 <210> 619  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> H. sapiens

	<400> 619	
	tcggttgctg ccgctgagga	20
5	<210> 620 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 620	
	cggttgctgc cgctgaggag	20
15	<210> 621 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 621	
	gttgctgccg ctgaggagcc	20
25	<210> 622 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 622	
	ctgccgctga ggagcccgcc	20
35	<210> 623 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 623	
	accgcagctg gcgatggacc	20
45	<210> 624 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 624	
	cagctggcga tggaccgcc	20
55	<210> 625 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 625	
	gaacttacta tcatcctcta	20
65	<210> 626 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
70	<400> 626	
	tccaattgaa ctttcacata	20

<210> 627  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> H. sapiens  
 <400> 627  
 10 aaaattcaaa ctgcctatat 20  
 <210> 628  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> H. sapiens  
 <400> 628  
 gataaaacca tacagtgagc 20  
 20 <210> 629  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 25 <400> 629  
 ataaaacat acagtgagcc 20  
 30 <210> 630  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 35 <400> 630  
 aaccatacag tgagccagcc 20  
 40 <210> 631  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 631  
 45 accatacagt gagccagcct 20  
 <210> 632  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> H. sapiens  
 <400> 632  
 55 ccatacagtg agccagcctt 20  
 <210> 633  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 60 <400> 633  
 gtgagccagc cttgcagtag 20  
 65 <210> 634  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 634  
 5 ccagccttgc agtaggcagt 20  
 <210> 635  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 635  
 15 taggcagtag actataagca 20  
 <210> 636  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> H. sapiens  
 <400> 636  
 25 gcagtagact ataagcagaa 20  
 <210> 637  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 30 <400> 637  
 tgaactggac ctgcacaaa 20  
 35 <210> 638  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 40 <400> 638  
 ctggacctgc accaaagctg 20  
 <210> 639  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 50 <400> 639  
 ggacctgcac caaagctggc 20  
 <210> 640  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 55 <400> 640  
 60 ctgcacaaa gctggcacca 20  
 <210> 641  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> H. sapiens

	<400> 641	
	accaaagctg gcaccagggc	20
5	<210> 642 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 642	
	ctcggagggt ctctgaactc	20
15	<210> 643 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 643	
	aactcagaag gatggcattt	20
25	<210> 644 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 644	
	ctcagaagga tggcattttt	20
35	<210> 645 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 645	
	atcaggatct gagttatttt	20
45	<210> 646 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 646	
	aggatctgag ttattttgct	20
55	<210> 647 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 647	
	ctgagttatt ttgctaaact	20
65	<210> 648 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 648	
	attttgctaa acttggggga	20



<210> 649  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> H. sapiens  
 <400> 649  
 taaactggg ggaggaggaa 20  
 10 <210> 650  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 15 <400> 650  
 ggaacaaata aatggagtct 20  
 20 <210> 651  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 25 <400> 651  
 gtttgaact caagcagaag 20  
 30 <210> 652  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 35 <400> 652  
 ttgtaactca agcagaaggt 20  
 40 <210> 653  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 653  
 45 gtaactcaag cagaaggtgc 20  
 <210> 654  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> H. sapiens  
 <400> 654  
 aactcaagca gaaggtgcga 20  
 55 <210> 655  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 60 <400> 655  
 ctcaagcaga aggtgcgaag 20  
 65 <210> 656  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 656  
 5 caagcagaag gtgcgaagca 20  
 <210> 657  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 657  
 15 agcagaaggt gcgaagcaga 20  
 <210> 658  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> H. sapiens  
 <400> 658  
 25 cagaaggtgc gaagcagact 20  
 <210> 659  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> H. sapiens  
 <400> 659  
 gaaggtgcga agcagactga 20  
 35 <210> 660  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 40 <400> 660  
 aggtgcgaag cagactgagg 20  
 <210> 661  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 45 <400> 661  
 50 gtgcgaagca gactgaggct 20  
 <210> 662  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> H. sapiens  
 <400> 662  
 60 gcgaagcaga ctgaggctac 20  
 <210> 663  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> H. sapiens

	<400> 663	
	gaagcagact gaggctacca	20
5	<210> 664 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 664	
	agcagactga ggctaccatg	20
15	<210> 665 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 665	
	cagactgagg ctaccatgac	20
25	<210> 666 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 666	
	gactgaggct accatgacat	20
35	<210> 667 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 667	
	ctgaggctac catgacattc	20
45	<210> 668 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 668	
	gaggctacca tgacattcaa	20
55	<210> 669 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 669	
	ggctaccatg acattcaaat	20
65	<210> 670 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
70	<400> 670	
	ctaccatgac attcaaatat	20

<210> 671  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> H. sapiens  
 <400> 671  
 cctgaagctg catgtggctg 20  
 10 <210> 672  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 15 <400> 672  
 tgaagctgca tgtggctggt 20  
 20 <210> 673  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 25 <400> 673  
 aagctgcatg tggctggtaa 20  
 30 <210> 674  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 35 <400> 674  
 gctgcatgtg gctgtaacc 20  
 40 <210> 675  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 675 20  
 45 tgcattgtggc ttgtaacctt 20  
 <210> 676  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> H. sapiens  
 <400> 676  
 catgtggctg gtaacctaaa 20  
 55 <210> 677  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 60 <400> 677  
 tgtggctggt aacctaaaag 20  
 65 <210> 678  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 <400> 678  
 5      tggctggtaa cctaaaagga           20  
  
 <210> 679  
 <211> 20  
 10     <212> ADN  
       <213> H. sapiens  
  
 <400> 679  
 15     gctggtaacc taaaaggagc           20  
  
 <210> 680  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20     <213> H. sapiens  
  
 <400> 680  
 25     tggtaaccta aaaggagcct           20  
  
 <210> 681  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30     <213> H. sapiens  
  
 <400> 681  
 35     gtaacctaaa aggagcctac           20  
  
 <210> 682  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 40     <400> 682  
  
 aacctaaaag gagcctacca           20  
  
 <210> 683  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 45     <400> 683  
 50     cctaaaagga gcctacaaa           20  
  
 <210> 684  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 55     <400> 684  
 60     ggcgcgaagc agactgaggc           20  
  
 <210> 685  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65     <213> H. sapiens

	<400> 685	
	cactatgttc atgagggagg	20
5	<210> 686 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 686	
	ccatcatagg ttctgacgtc	20
15	<210> 687 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 687	
	gaagctgatt gactcactca	20
25	<210> 688 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 688	
	ttgtaactca agcagaaggc	20
35	<210> 689 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 689	
	gtaactcaag cagaaggcgc	20
45	<210> 690 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 690	
	aactcaagca gaaggcgcga	20
55	<210> 691 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 691	
	ctcaagcaga aggcgcgaag	20
65	<210> 692 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
70	<400> 692	
	cagaaggcgc gaagcagact	20

<210> 693  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> H. sapiens  
  
 <400> 693  
  
 10 gaaggcgcga agcagactga 20  
  
 <210> 694  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> H. sapiens  
  
 <400> 694  
  
 aggcgcgaag cagactgagg 20  
  
 20 <210> 695  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 25 <400> 695  
  
 gcgcgaagca gactgaggct 20  
  
 30 <210> 696  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 35 <400> 696  
  
 gaagcagact gaggctacca 20  
  
 40 <210> 697  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 <400> 697  
  
 45 cagaaggcgc gaagcagact 20  
  
 <210> 698  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> H. sapiens  
  
 <400> 698  
  
 55 tctttctct gtcttacaga 20  
  
 <210> 699  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 60 <213> H. sapiens  
  
 <400> 699  
  
 cccacgtag aagatgcgac 20  
  
 65 <210> 700  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 <400> 700  
 5     aatatgtag acatgagcca             20  
  
 <210> 701  
 <211> 20  
 10     <212> ADN  
       <213> H. sapiens  
  
       <400> 701  
 15     cattagctgc attcaactg           20  
  
       <210> 702  
       <211> 20  
       <212> ADN  
 20     <213> H. sapiens  
  
       <400> 702  
 25     acttcactc ctagtctgca           20  
  
       <210> 703  
       <211> 20  
       <212> ADN  
 30     <213> H. sapiens  
  
       <400> 703  
       ccatgtccag gtaagtcag         20  
 35     <210> 704  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> H. sapiens  
  
 40     <400> 704  
  
       gcaccaggca cggatgtgac         20  
 45     <210> 705  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> H. sapiens  
  
       <400> 705  
 50     gtgggtccc agaggcactg           20  
  
       <210> 706  
       <211> 20  
 55     <212> ADN  
       <213> H. sapiens  
  
       <400> 706  
 60     gctgatcggc cactgcagct         20  
  
       <210> 707  
       <211> 20  
       <212> ADN  
 65     <213> H. sapiens



	<400> 707	
	tccacgtggc tggggaggtc	20
5	<210> 708 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 708	
	tgtaatgtat ggtgatcaga	20
15	<210> 709 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 709	
	gagagtaccc agtgggaaat	20
25	<210> 710 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 710	
	agtcagcatg ggcttcagcc	20
35	<210> 711 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 711	
	caaagaatg actgtccaac	20
45	<210> 712 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 712	
	gaatgactgt ccaacaagtg	20
55	<210> 713 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 713	
	tatctactgt aatttaaata	20
65	<210> 714 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 714	
	ctgatatggg tggagaacag	20

ES 2 417 879 T3

<210> 715  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> H. sapiens  
 <400> 715  
 tctgggacag gtatgagctc 20  
 10  
 <210> 716  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> H. sapiens  
 <400> 716  
 tgatagcagt ggccctgaa 20  
 20  
 <210> 717  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 25 <400> 717  
 ggattggcgt gaaatactgg 20  
 30  
 <210> 718  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 35 <400> 718 20  
 tgcccgaggt tcctcctgcc 20  
 40  
 <210> 719  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 719  
 45 gcactagcaa gaccacactc 20  
 <210> 720  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> H. sapiens  
 <400> 720  
 caagaccaca ctctgcatag 20  
 55  
 <210> 721  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 60 <400> 721  
 tcctccatag gataccgtgt 20  
 65  
 <210> 722  
 <211> 20

ES 2 417 879 T3

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 <400> 722  
 5       ggatgtaggg cagcaaaacc           20  
  
 <210> 723  
 <211> 20  
 10       <212> ADN  
           <213> H. sapiens  
  
           <400> 723  
 15       tctgcacaag gactcctgt           20  
  
           <210> 724  
           <211> 20  
           <212> ADN  
 20       <213> H. sapiens  
  
           <400> 724  
 25       cagcctgtct cagtgaacat           20  
  
           <210> 725  
           <211> 20  
           <212> ADN  
 30       <213> H. sapiens  
  
           <400> 725 20  
           caggatgctt ccagtctaata           20  
 35       <210> 726  
           <211> 20  
           <212> ADN  
           <213> H. sapiens  
 40       <400> 726  
  
           aaatgctcgt ctccaatctc           20  
  
           <210> 727  
           <211> 20  
           <212> ADN  
 45       <213> H. sapiens  
  
           <400> 727  
 50       aacttggtga tccaaatcca           20  
  
           <210> 728  
           <211> 20  
           <212> ADN  
 55       <213> H. sapiens  
  
           <400> 728 20  
 60       tgacatggtg tgcttccttg           20  
  
           <210> 729  
           <211> 20  
           <212> ADN  
 65       <213> H. sapiens

<400> 729 20  
 acaactggtgt tctggctacc 20  
 5 <210> 730  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 10 <400> 730  
 ggttctggc taccttagt 20  
 <210> 731  
 15 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 20 <400> 731  
 tcctggcata ggtcacagta 20  
 <210> 732  
 25 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 732  
 30 atgtcaacag tagcacctcc 20  
 <210> 733  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> H. sapiens  
 <400> 733  
 40 tagactcaga caagtctgga 20  
 <210> 734  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 45 <400> 734  
 cctaagttgc tcattctgg 20  
 50 <210> 735  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 55 <400> 735  
 tgcgctgagt tccatgaaac 20  
 <210> 736  
 60 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 736  
 65 ctattgcagg tgctctccag 20

<210> 737  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> H. sapiens  
  
 <400> 737  
  
 10 cagaggaaca tctgcacct 20  
  
 <210> 738  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> H. sapiens  
  
 <400> 738  
  
 ctctgctcct tactcttg 20  
  
 20 <210> 739  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 25 <400> 739  
  
 gtaatttctc accatccatc 20  
  
 <210> 740  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 35 <400> 740  
  
 ttctgagtct caattgtcta 20  
  
 <210> 741  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 40 <213> H. sapiens  
  
 <400> 741  
  
 45 ctatgctcct gtgtgcacat 20  
  
 <210> 742  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> H. sapiens  
  
 <400> 742  
  
 gcctattgcc attgtatgt 20  
  
 55 <210> 743  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 60 <400> 743  
  
 ctattcatgt cctttgccta 20  
  
 65 <210> 744  
 <211> 20

ES 2 417 879 T3

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 744  
 5 gattctgcgg gtaatctcag 20  
 <210> 745  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 745  
 15 tcaatgcagg tcattggaaa 20  
 <210> 746  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> H. sapiens  
 <400> 746  
 25 ctaccagatt gaccatccct 20  
 <210> 747  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> H. sapiens  
 <400> 747  
 tacttgatag tgctctagga 20  
 35 <210> 748  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 40 <400> 748  
 ttgactgcag gaccaggagg 20  
 45 <210> 749  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 749  
 50 aacaaacact tgtgcaaatg 20  
 <210> 750  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 750  
 60 aatgagacca aactccact 20  
 <210> 751  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> H. sapiens

	<400> 751	
	ttccactftg aagctagcaa	20
5	<210> 752 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 752	
	gatctggagc ttattctga	20
15	<210> 753 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 753	
	acctcatgtg acttgatgc	20
25	<210> 754 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 754	
	ttcttaagaa acaccttga	20
35	<210> 755 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 755	
	taggcccatc ctggctgcat	20
45	<210> 756 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 756	
	aaactctcag gatatggtaa	20
50	<210> 757 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
55	<400> 757	
	ataccttct ctaccttgc	20
60	<210> 758 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
65	<400> 758	
	tacctttgct gaaggtcct	20

	<210> 759	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> H. sapiens	
	<400> 759	
10	atctatctag tgaaatttct	20
	<210> 760	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> H. sapiens	
	<400> 760	
	tcagctcatc aaaatagct	20
20	<210> 761	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
25	<400> 761	
	atatgctagt ccttccttc	20
30	<210> 762	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
35	<400> 762	
	caaaggctg agttatccag	20
40	<210> 763	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 763	
45	tgacttatag atgcaggctg	20
50	<210> 764	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 764	
55	tcagtgagg gtaattctt	20
60	<210> 765	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> H. sapiens	
	<400> 765	
	tgcttagcca gttgaaaga	20
65	<210> 766	
	<211> 20	



ES 2 417 879 T3

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 766  
 5 cctgcagaat ttgccaggc 20  
 <210> 767  
 <211> 20  
 10 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 767  
 15 gttagctaggt aggtaaagca 20  
 <210> 768  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> H. sapiens  
 <400> 768  
 25 ttgagtgaga cacacaaggt 20  
 <210> 769  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> H. sapiens  
 <400> 769  
 35 gtgctagtca gggaatgcat 20  
 <210> 770  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 40 <400> 770  
 45 ggggagagag catgcccagc 20  
 <210> 771  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 50 <400> 771  
 55 gcatgcccag ctgcgaaagc 20  
 <210> 772  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 60 <400> 772  
 65 agccaggtat agaaaggagt 20  
 <210> 773  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens

	<400> 773	
	aactttctaa gaggcagaat	20
5	<210> 774 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 774	
	tcttagtctg gtcatgagtg	20
15	<210> 775 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 775	
	agtaggagat ttcatatgaa	20
25	<210> 776 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 776	
	tcttcaccag caacacatta	20
35	<210> 777 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 777	
	atggccacct agcatggcac	20
45	<210> 778 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 778	
	catgtttctg agcctccaga	20
55	<210> 779 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 779	
	taggtggctc cctgtcttca	20
65	<210> 780 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
70	<400> 780	
	tccaaagtct tgggaatcct	20

<210> 781  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> H. sapiens  
 <400> 781  
 acaaagaaag ggggagttgg 20  
 10 <210> 782  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 15 <400> 782  
 tcgtgtcttc ctggcccaga 20  
 20 <210> 783  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 25 <400> 783  
 gcagtgccca gcacacaata 20  
 30 <210> 784  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 35 <400> 784  
 actcgtccag gtgcgaagca 20  
 40 <210> 785  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 <400> 785  
 45 gccacctaag gtaaagaagg 20  
 <210> 786  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> H. sapiens  
 <400> 786  
 atcagagtgg cagagagagc 20  
 55 <210> 787  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 60 <400> 787  
 ttaccatag ttgtgacaca 20  
 65 <210> 788  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 <400> 788  
 5     cattttgtag gcaatgagct             20  
  
 <210> 789  
 <211> 20  
 10     <212> ADN  
       <213> H. sapiens  
  
 <400> 789  
 15     gcattagtaa acatgagaac           20  
  
 <210> 790  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20     <213> H. sapiens  
  
 <400> 790  
 25     ttcatttcag cgatggccgg           20  
  
 <210> 791  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30     <213> H. sapiens  
  
 <400> 791  
 35     gaaaatctag tgtcattcaa           20  
  
 <210> 792  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
 40     <400> 792  
  
 tcctatacag ttttgggaac             20  
  
 <210> 793  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 <400> 793  
 50     aaggacttca gtatggagct           20  
  
 <210> 794  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> H. sapiens  
  
 <400> 794  
 55     atggagcctt tattgaattg           20  
  
 <210> 795  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65     <213> H. sapiens

	<400> 795	
	ccatcagcac tattattat	20
5	<210> 796 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
10	<400> 796	
	ataggcaagc tcagccatag	20
15	<210> 797 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
20	<400> 797	
	tgctagatga gatacatcaa	20
25	<210> 798 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
30	<400> 798	
	gaagaccaa catggttcta	20
35	<210> 799 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
40	<400> 799	
	ctctgttag tcctccag	20
45	<210> 800 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
50	<400> 800	
	cattgataaa atgttctggc	20
55	<210> 801 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
60	<400> 801	
	tctggcacag caaacctct	20
65	<210> 802 <211> 20 <212> ADN <213> H. sapiens	
	<400> 802	
	tggcacagca aaacctctag	20

<210> 803  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 5 <213> H. sapiens  
  
 <400> 803  
  
 10 tagaacacat agtgtgattt 20  
  
 <210> 804  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> H. sapiens  
  
 <400> 804  
  
 aacacatagt gtgatttaag 20  
  
 20 <210> 805  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 805  
  
 30 ctttccgttg gaccctggg 20  
  
 <210> 806  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 40 <400> 806  
  
 tcccgctgt gacatgcatt 20  
  
 <210> 807  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 807  
  
 55 ttctacctcg cgcgatttac 20  
  
 <210> 808  
 <211> 432  
 <212> ADN  
 60 <213> O. cuniculus  
  
 <400> 808

ES 2 417 879 T3

gatcttacct tctccaagca aaatgcattg ctacgtgctg agtatcaggc tgattacaag 60  
 tcaactgaggt tcttcaccct gctttctggg ttggtgaata cccatgggtct tgaattaaat 120  
 gctgacatct tgggcaactga caaaatgaat actgctgctc acaaggcaac tctaagaatt 180  
 ggccaaaatg gagtatctac cagtgaaca accagcttga ggtacagtcc cctgatgctg 240  
 gagaatgagc tgaacgcaga gcttgccctt tctggggcat ctatgaaatt agcaacaaat 300  
 ggccgcttca aggaacacaa tgcaaaattc agcctagatg ggaaagctac cctcacagag 360  
 ttatccctgg gaagcgctta ccaggccatg attctgggtg ctgacagcaa gaacattttc 420  
 aacttcaaga tc 432

5 <210> 809  
 <211> 660  
 <212> ADN  
 <213> O. cuniculus

<400> 809

10 ctgggaaaac tcccacagca agttaatgat tatctgagta cattcaattg ggagagacaa 60  
 gtttccagtg ccaaggagaa actaactact ttcacaaaaa attataaaat tacagagaat 120  
 gatatacaaa ctgcattgga taatgcaaaa atcaacttaa atgaaaaact gtctcaactt 180  
 cagacatatg tgatataatt tgatcagtat attaaagata attttgatct acatgatttt 240  
 aaaatagcta tagctagtat tatagatcaa atcatggaaa aattaaat tcttgatgaa 300  
 cgttatcata tccgtgcaca ttaattaa tcaatccata atttatattt gtttattgaa 360  
 gctattgatt ttaacaaaat tggaagtagt actgcatctt ggattcaaaa tgtggatacc 420  
 aagtatcaag tcagaatctg gatacaagaa atattgcaac agtttaagac acagattcag 480  
 aatacaaaaca tcccatacct ggctgaaaaa ctgaaacaac agattgaggc tattgatgtc 540  
 agagtgcctt tagatcaatt gagaactaca attccatttc gtataataaa ggacattatt 600  
 gaacatttca aatactttgt tataaatatt attgaaaatt ttgaagtaat tgacaaaatc 660

15 <210> 810  
 <211> 543  
 <212> ADN  
 <213> O. cuniculus

<220>

20 <221> característica\_misc  
 <222> (45)  
 <223> n = a, c, g, o t

<220>

25 <221> característica\_misc  
 <222> (118)  
 <223> n = a, c, g, o t

<220>

30 <221> característica\_misc  
 <222> (148)  
 <223> n = a, c, g, o t

<220>

35 <221> característica\_misc  
 <222> (173)  
 <223> n = a, c, g, o t

<220>

40 <221> característica\_misc

ES 2 417 879 T3

<222> (180)  
 <223> n = a, c, g, o t

<400> 810

5 cagaacatcg gagacaacgc attggatttt ctactaaat cttanaatga agcaaaaatt 60  
 aagtttgata agtacaaagt tgaaaaatcg ctcaacaggc tccccaggac ctttcagnct 120  
 cctggataca ttattccaat tttcaatntt gaagtatctc cactcacaat agnagacgtn 180  
 agcattcagt catgtgatcc caaaatcaat aagcaccccc aatgtcacca tcctggattc 240  
 aagcttctat gtgccttcat atacattggc tctgcatcc cttagagctgc cagtcttcca 300  
 tgtccccagg aatctactca aggtctctct tccagatttc aaggaattga aaaccattaa 360  
 caatattttt attccagcca tgggcaacat tacctatgaa ttttccttca aatcaacgat 420  
 cattacactg aataccaatg ctggacttta taaccaatca gacattgttg cccatatacct 480  
 ttcttctctt tcactctgtca ttgatgcact acagtacaaa ttagagggca cgctcaagtt 540  
 tga 543

<210> 811  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 811

aagcaccccc aatgtcacc 19

<210> 812  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador

<400> 812

gggatggcag agccaatgta 20

<210> 813  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sonda

<400> 813

tcctggattc aagcttctat gtgccttca 29

<210> 814  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido



<400> 814  
 tgcttgaga aggtaagatc 20

5 <210> 815  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 815

15 gcgttgctc cgatgtctg 20  
 <210> 816  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 816  
 taatcattaa ctgctgtgg 20  
 <210> 817  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 817

40 tcagcacgta gcaatgcatt 20  
 <210> 818  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 818

50 gcctgatact cagcacgtag 20  
 <210> 819  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

60 <400> 819  
 caattgaatg tactcagata 20

65 <210> 820  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 820  
  
 acctcagtga ctgtaatca 20  
 10  
 <210> 821  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 821  
 20  
 cactggaaac ttgtctctcc 20  
  
 <210> 822  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30  
 <400> 822  
  
 agtagtagt ttctcctgg 20  
 35  
 <210> 823  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 823  
 45  
 tcagtgccca agatgcagc 20  
  
 <210> 824  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 55  
 <400> 824  
  
 attggaataa tgtatccagg 20  
 60  
 <210> 825  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 825  
 ttgcattat ccaatgcagt 20

5 <210> 826  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 826

15 gttgccttgt gagcagcagt 20  
 <210> 827  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 827  
 attgtgagtg gagatacttc 20  
 <210> 828  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 828

40 catatgtctg aagttgagac 20  
 <210> 829  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 829

50 gtagatactc catttggcc 20  
 <210> 830  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

60 <400> 830  
 ggatcacatg actgaatgct 20

65 <210> 831  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 831  
  
 tcaagctggt tgtgcactg 20  
 10  
 <210> 832  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 832  
 20  
 ggactgtacc tcaagctggt 20  
  
 <210> 833  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30  
 <400> 833  
  
 gctcattctc cagcatcagg 20  
 35  
 <210> 834  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 834  
 45 ttgatctata atactagcta 20  
  
 <210> 835  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 55  
 <400> 835  
  
 atggaagact ggcagctcta 20  
 60  
 <210> 836  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 836  
 ttgtgtcct tgaagcggcc 20  
 5 <210> 837  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 837  
 15 tgtgcacgga tatgataacg 20  
 <210> 838  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 25 <400> 838  
 gaccttgagt agattcctgg 20  
 <210> 839  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 839  
 40 gaaatctgga agagagacct 20  
 <210> 840  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 840  
 50 gtagcttcc catctaggct 20  
 <210> 841  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 60 <400> 841  
 gataactctg tgaggtagc 20  
 65 <210> 842  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 842  
  
 atgttgccca tggctggaat 20  
 10  
 <210> 843  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 843  
 20  
 aagatgcagt actactcca 20  
  
 <210> 844  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30  
 <400> 844  
  
 gcacccagaa tcatggcctg 20  
 35  
 <210> 845  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 845  
 45  
 ctgatactt ggtatccaca 20  
  
 <210> 846  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 55  
 <400> 846  
  
 cagtgtaatg atcgttgatt 20  
 60  
 <210> 847  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 847  
 taaagtccag cattggatt 20

5 <210> 848  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 848

15 caacaatgtc tgattggta 20  
 <210> 849  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 849  
 gaagaggaag aaaggatag 20  
 <210> 850  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 35 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 850

40 tgacagatga agaggaagaa 20  
 <210> 851  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 <400> 851

50 ttgtactgta gtgcatcaat 20  
 <210> 852  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

60 <400> 852  
 gcctcaatct gttgttcag 20

65 <210> 853  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 853  
  
 actgagcgt gccctctaat 20  
 10  
 <210> 854  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 854  
 20  
 gaaatggaat thtagttctc 20  
  
 <210> 855  
 <211> 479  
 25 <212> ADN  
 <213> M. fascicularis  
  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 30 <222> (7)  
 <223> n = A,T,C o G  
  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 35 <222>(469)..(474)  
 <223> n = A,T,C o G  
  
 <220>  
 <221> característica\_misc  
 40 <222> (476)..( 479)  
 <223> n = A,T,C o G  
  
 <400> 855  
  
 tgcgtcnaga ctccgcccc tactatccgc tgaccgggga caccagatta gagctggaac 60  
 tgaggcctac aggagaagtt gagcagtatt ctgtcagtc aacctatgag ctccagagag 120  
 aggacagagc cttggtggac accctgaagt ttgtaactca agcagaaggt gtaaagcaga 180  
 ctgaggctac catgacattc aaatataatc ggcagagtat gaccttgtcc agtgaagtcc 240  
 aaattccgga tttgagggtt gaccttgga caatcctcag agttaatgat gaatctactg 300  
 agggcagaaa gtcttacaga ctcaccctgg acattcagaa ccagaaaatt actgagggtca 360  
 ccctcatggg ccacctaaagt tgtgacacaa aggaagaagg aaaaatcaaa ggtgttattt 420  
 45 ccgtaccccg tttgcaagca gaagccagaa gtgagatcct cgcccacann nnnnnnnn 479  
  
 <210> 856  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido



<400> 856  
gtccctcaac atctgaatgc 20

5 <210> 857  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido  
<400> 857

15 ctgctagcct ctggattga 20  
<210> 858  
<211> 20  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 858  
ccttcctga aggtcctcc 20  
<210> 859  
30 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
35 <223> Oligonucleótido Antisentido  
<400> 859

40 ctcttactgt gctgtggaca 20  
<210> 860  
<211> 13938  
<212> ADN  
<213> H. sapiens

45 <400> 860

ES 2 417 879 T3

ctgggattgg	gacacacttt	ctggacactg	ctggccagtc	ccaaaatgga	acataaggaa	60
gtggttcttc	tacttctttt	atftctgaaa	tcagcagcac	ctgagcaaag	ccatgtggtc	120
caggattgct	accatggtga	tggacagagt	tatcgaggca	cgtaactccac	cactgtcaca	180
ggaaggacct	gccaagcttg	gtcatctatg	acaccacatc	aacataatag	gaccacagaa	240
aactacccaa	atgctggctt	gatcatgaac	tactgcagga	atccagatgc	tgtggcagct	300
ccttattgtt	atacgaggga	tcccgggtgc	agggtgggagt	actgcaacct	gacgcaatgc	360
tcagacgcag	aagggactgc	cgctcgcgct	ccgactgtta	ccccggttcc	aagcctagag	420
gctccttccg	aacaagcacc	gactgagcaa	aggcctgggg	tgcaggagtg	ctaccatggt	480
aatggacaga	gttatcgagg	cacatactcc	accactgtca	caggaagaac	ctgccaagct	540
tggtcatcta	tgacaccaca	ctcgcatagt	cggaccccag	aatactacc	aaatgctggc	600
ttgatcatga	actactgcag	gaatccagat	gctgtggcag	ctccttattg	ttatacgagg	660
gatccccgtg	tcaggtggga	gtactgcaac	ctgacgcaat	gctcagacgc	agaagggact	720
gccgtcgcgc	ctccgactgt	taccccgggt	ccaagcctag	aggctccttc	cgaacaagca	780
ccgactgagc	aaaggcctgg	ggtgcaggag	tgctaccatg	gtaatggaca	gagttatcga	840
ggcacatact	ccaccactgt	cacaggaaga	acctgccaag	cttggtcatc	tatgacacca	900
cactcgcata	gtcggacccc	agaatactac	ccaaatgctg	gcttgatcat	gaactactgc	960
aggaatccag	atgctgtggc	agctccttat	tgttatacga	gggatcccgg	tgtcagggtg	1020
gagtactgca	acctgacgca	atgctcagac	gcagaagggg	ctgccgtcgc	gcctccgact	1080
gttaccgccg	ttccaagcct	agaggctcct	tccgaacaag	caccgactga	gcaaagcct	1140
ggggtgcagg	agtgtacca	tggtaatgga	cagagttatc	gaggcacata	ctccaccact	1200
gtcacaggaa	gaacctgcca	agcttgggtca	tctatgacac	cacactcgca	tagtcggacc	1260
ccagaatact	acccaaatgc	tggcttgatc	atgaactact	gcaggaatcc	agatgctgtg	1320
gcagctcctt	attgttatac	gagggatccc	ggtgtcaggt	gggagtactg	caacctgacg	1380
caatgctcag	acgcagaagg	gactgccgtc	gcgcctccga	ctgttacc	ggttccaagc	1440







<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Cebador PCR  
  
 <400> 861  
  
 10 cagctcctta ttgtatacg aggga 25  
  
 <210> 862  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Cebador PCR  
  
 <400> 862  
 20  
 tgcgtctgag cattgcgt 18  
  
 <210> 863  
 <211> 24  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sonda PCR  
 30  
 <400> 863  
  
 cccgggtgca ggtgggagta ctgc 24  
 35  
 <210> 864  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 864  
 45 gcctcagtct tcttcgcacc 20  
  
 <210> 865  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 55  
 <400> 865  
  
 gcctcagtct tattcgcacc 20  
 60  
 <210> 866  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 866  
gcctcagtat tattcgacc 20

5 <210> 867  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido  
<400> 867

15 gcctcattat tattcgacc 20  
<210> 868  
<211> 20  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 868  
gcctcattat tattagcacc 20  
<210> 869  
30 <211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
35 <223> Oligonucleótido Antisentido  
<400> 869

40 gcctcattat tattatcacc 20  
<210> 870  
<211> 20  
<212> ADN  
45 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido  
<400> 870

50 gcctaattat tattatcacc 20  
<210> 871  
<211> 19  
55 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
60 <223> Oligonucleótido Antisentido  
<400> 871

gcctcagtct gcttcgcac 19

65 <210> 872  
<211> 18

<212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 872  
  
 gcctcagtct gcttcgca 18  
 10  
 <210> 873  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 873  
 20  
 gcctcagtct gcttc 15  
  
 <210> 874  
 <211> 18  
 25 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30  
 <400> 874  
  
 cctcagtctg cttcgac 18  
 35  
 <210> 875  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 875 16  
 45 ctcagtctgc ttcgca 16  
  
 <210> 876  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 876  
 55  
 tcagtctgct tcgc 14  
  
 <210> 877  
 60 <211> 10  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 65 <223> Oligonucleótido Antisentido



<400> 877  
gcctcagtct 10

5 <210> 878  
<211> 10  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

10 <220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido  
<400> 878

15 gcttcgcacc 10  
<210> 879  
<211> 20  
<212> ARN  
20 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 879  
uugaagccau acaccucuuu 20  
<210> 880  
30 <211> 20  
<212> ARN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
35 <223> Oligonucleótido Antisentido  
<400> 880

40 ugaccaggac ugccuguucu 20  
<210> 881  
<211> 20  
<212> ARN  
45 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido  
<400> 881

50 gaauaggcgu guagcuguuaa 20  
<210> 882  
<211> 20  
55 <212> ARN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido Antisentido

60 <400> 882  
uauacugauc aaauuguauc 20

65 <210> 883  
<211> 20

<212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 883  
  
 uggaaucug guaugugaag 20  
 10  
 <210> 884  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 884  
 20  
 aaaucaaaug auugcuuugu 20  
  
 <210> 885  
 <211> 20  
 25 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 30  
 <400> 885  
  
 gugaugacac uugauuuaaa 20  
 35 <210> 886  
  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
  
 <400> 886  
 45 gaagcugccu cuucuucca 20  
  
 <210> 887  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 50 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido  
 55  
 <400> 887  
  
 gagaguuggu cugaaaaauc 20  
 60  
 <210> 888  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 65 <223> Oligonucleótido Antisentido

ES 2 417 879 T3

<400> 888  
 gtgcgcgcga gcccgaaatc 20

5 <210> 889  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 889

15 cuucuggcau ccgguuuagt t 21

<210> 890  
 <211> 466  
 <212> ADN  
 <213> M. fascicularis

20 <220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> 9

25 <223> n = A,T,C o G

<400> 890

ggatcggcng	accctgagct	gcatatggct	ggtaatctaa	aaggagccta	ccaaaataat	60
gaaataaaac	acatctatac	catctcttct	gctgccttat	cagcaagcta	caaagcagac	120
actgttgcta	aggttcaggg	tgtggagttt	agccatcggc	tcaacacaga	catcgctggg	180
ctggcttcag	ccattgacat	tagcaciaaac	tataattcag	actcattgca	tttcagcaat	240
gtcttcatt	ctgtaatggc	tccatttacc	atgaccattg	atacacatac	aaatggcaac	300
gggaaacttg	ttctctgggg	agaacatact	gggcagctgt	atagcaaatt	cctgttgaaa	360
gcagaacctc	tggcattcac	tttctctcat	gattacaaag	gctccacgag	tcatcatctc	420
atgtcttagga	aaagcatcag	tgcagctctt	gaacacaaag	tcagta		466

30 <210> 891  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 891

40 gcctcagtct gctttacacc 20

<210> 892  
 <211> 20

45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido Antisentido

50 <400> 892

agattaccag ccatatgcag 20

55

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto oligonucleótido antisentido de 20 bases nucleicas de longitud que tiene una secuencia de bases nucleicas como se expone en la SEQ ID NO: 247 y que comprende 5-metilcitosina en las bases nucleicas 2, 3, 5, 9, 12, 15, 17, 19 y 20, en el que cada enlace internucleósido es un enlace fosforotioato, las bases nucleicas 1-5 y 16-20 comprenden una modificación 2'-metoxietoxilo, y las bases nucleicas 6-15 son desoxinucleótidos.
2. El compuesto oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en el que el compuesto es una sal farmacéuticamente aceptable.
3. El compuesto oligonucleótido antisentido de la reivindicación 2, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal formada con el sodio catiónico.
4. Una composición que comprende el compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las realizaciones 1 a 3, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
5. El compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 4, para usar en la terapia o profilaxis de una enfermedad.
6. El compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 4, para usar en el tratamiento de la hipercolesterolemia en un ser humano.
7. El compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 4, para usar en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, tal como la aterosclerosis, en un ser humano.
8. El compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 4, para usar en el tratamiento de la hiperlipidemia en un ser humano.
9. El compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 4, para usar en el tratamiento de la diabetes en un ser humano.
10. El compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 4, para usar en el tratamiento de la obesidad en un ser humano.
11. Uso del compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para preparar un medicamento para tratar la hipercolesterolemia en un ser humano.
12. Uso del compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para preparar un medicamento para tratar una enfermedad cardiovascular, tal como la aterosclerosis, en un ser humano.
13. Uso del compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para preparar un medicamento para tratar la hiperlipidemia en un ser humano.
14. Uso del compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para preparar un medicamento para tratar la diabetes en un ser humano.
15. Uso del compuesto oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para preparar un medicamento para tratar la obesidad en un ser humano.
16. El compuesto oligonucleótido antisentido o la composición de la reivindicación 6, o el uso de la reivindicación 11, en el que la hipercolesterolemia es hipercolesterolemia familiar.