

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 791**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/22 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2005 E 05808592 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 1796732**

54 Título: **Moléculas de ARN de interferencia pequeñas modificadas y métodos de uso**

30 Prioridad:

01.10.2004 US 614955 P

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

06.02.2014

73 Titular/es:

**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS, INC.
(100.0%)
INTELLECTUAL PROPERTY - R440 P.O. BOX
8097
EMERYVILLE, CA 94662-8097, US**

72 Inventor/es:

**HAN, JANG y
HOUGHTON, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 441 791 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

Moléculas de ARN de interferencia pequeñas modificadas y métodos de uso

5 **Antecedentes de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de detección de ácido nucleico y al fenómeno de ARN silenciador o ARN de interferencia (ARNi). ARN silenciador constituye un fenómeno en el que las moléculas de ARN no codificadoras median supresión de gen específico en un organismo. Por naturaleza, el fenómeno protege al genoma de un organismo de ácidos nucleicos invasores externos tales como transposones, transgenes y genes virales.

15 La introducción de ARN de doble cadena (ARNdc) en una célula desencadena al ARN silenciador, que después degrada en mARN endógeno correspondiente al ARNdc. Las secuencias de ARN silenciador implican una conversión de ARNdc en ARNs de interferencia cortos (ARNsis) que dirigen ribonucleasas a las dianas de mARN (Baulcombe et al., 2001). Una enzima llamada Dicer procesa el ARNdc a ARNsis, que tienen una longitud de 20-25 nucleótidos. Los ARNsis se montan en complejos que contienen endorribonucleasa conocidos como complejos silenciadores inducidos por ARN (RISCs). Posteriormente, los ARNsis guían a los RISCs a moléculas complementarias de ARN, donde los RISCs se parten y destruyen mARN diana. Cantidades pequeñas de ARNdc pueden silenciar una gran cantidad de mARN diana debido a un componente de amplificación de ARN silenciador (Fire et al., Nature, 391:806-811) (1998).

25 La primera evidencia de que ARNdc produce un gen silenciador eficiente a través de ARNi vino de estudios sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., Nature, 391:806-811 (1998) y Patente de Estados Unidos N° 6.506.559). Estudios posteriores sobre la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* demostraron que ARNi es un mecanismo multi-etapa (Elbashir et al., Genes Dev., 15(2): 188-200 (2001)).

30 Aunque ARNdc puede medir interferencia mediada por gen en células mamíferas (Wianny, F. y Zernicka-Goetz, M., Nature Cell Bio. 2:70-75 (2000) Svoboda, P. et al., Development 17:4147-4156 (2000)), el uso de ARNi en células somáticas mamíferas a menudo está limitado por una activación de proteína quinasa dependiente de ARN (PKR), que inactiva el factor de traslación eIF2a, causa una supresión generalizada de síntesis de proteína y a menudo causa apoptosis (Gil, J. y Esteban, M., Apoptosis 5:107-114 (2000)).

35 Recientemente, ARNsi de aproximadamente 21 o 22 pares base de longitud, correspondiente a secuencias dirigidas de ARN o ADN, mostró afectar a la expresión de las secuencias dirigidas de células mamíferas (Elbashir, S.M., et al., Nature 411:494-498 (2001)). Sin embargo, no está claro que todas las secuencias de ARN o ADN de un genoma de célula de mamífero sean susceptibles a ARNsi. Tampoco es seguro que todos los tipos de célula mamífera posean la maquinaria necesaria para efectuar supresión específica de gen usando ARNsi. Además, ARNsi es de uso limitado por al menos dos razones: (a) la naturaleza temporal del efecto de supresión visto en células donde se ha administrado ARNsi, y (b) la necesidad de síntesis química de ARNsis antes de su uso (Tuschl, T., Nature Biotech, 20: 446-448 (2002)). También, ya que ARNsis son inestables in vivo, su efectividad a largo plazo es limitada.

45 Una invención que se dirige a estos retos mejorará la utilidad de ARNi para tratar enfermedad humana en el nivel de actividad de ácido nucleico. En particular, tal invención hará que ARNi sea una terapia más práctica para infecciones virales, tales como infecciones con VHC. Las terapias actuales para tales infecciones virales son muy limitadas, y tienden a tener bajos índices de respuesta.

WO2004/011647 desvela moléculas de ARNsi dirigidas a VHC

50 US2004/192626 desvela moléculas de ARNsi dirigidas a VHB.

US2003/206887 desvela moléculas de ARNsi dirigidas a VHB y VHC.

55 **Resumen de la invención**

La invención proporciona un método para la entrega de ARNsi a hepatocitos en un animal para fines terapéuticos, incluyendo la inactivación de un virus en un animal. El método comprende la administración de un fármaco que reduce el colesterol a un animal en conjunto con la administración de un ARNdc o ARNsi que se modifica para comprender además un colesterol como un ligando de enlace con el receptor (colesterol-ARNsi). El fármaco que reduce el colesterol puede administrarse antes de, en el mismo momento, o después de la administración del ARNsi etiquetado con colesterol. En una realización preferente, el fármaco que reduce el colesterol es una estatina.

60

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Fig. 1 representa la secuencia y estructura secundaria de 5' UTR del genoma de VHC. También proporciona secuencias específicas de ARNsi para inducir ARNi hacia VHC en células hepáticas.
- La Fig. 2 proporciona secuencias para varios ARNsis específicos de VHC que son útiles para inducir ARNi hacia VHC en células hepáticas. Cada ARNsi específico de VHC se identifica mediante la designación proporcionada en la primera columna.
- 10 La Fig. 3 muestra la secuencia nucleótida del coronavirus SARS.
- La Fig. 4 es una representación esquemática de los marcos abiertos de lectura del coronavirus SARS.
- 15 La Fig. 5 representa un replicón de VHC subgenómico contenido en la línea celular de hepatoma Huh 7, que se usó para comprobar la eficacia de ARNsi en células humanas de hígado.
- La Fig. 6 representa la respuesta de dosis de actividad de luciferasa normalizada en células Huh-7 que contienen el replicón de VHC subgenómico (línea 5-2), a las que se les administró diferentes concentraciones de ARNsi5. La actividad de luciferasa, que se midió el día 1, 2 y 3 después de la transfección, cayó con dosis crecientes de ARNsi. El ensayo de luciferasa se realizó usando un sistema de ensayo de Luciferasa disponible en Promega Corp. (Madison, WI), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 20 La Fig. 7 representa la especificidad de secuencia de ARNsi5 para inducir ARNi dirigido por VHC en células de hígado Huh-7.
- 25 La Fig. 8 demuestra que ARNsi5 es no tóxico para células Huh-7. Los niveles de ATPasa se analizaron usando un kit de ensayo de ATPasa disponible en Promega Corp. (Madison, WI), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 30 La Fig. 9 representa los efectos de ARNsi5 en la réplica de VHC en células 21-5 (células Huh-7 que contienen VHC de longitud completa), como lo mide el ensayo de ARN. Los niveles de ARN se analizaron usando el kit de ARN TaqMan™ (F. Hoffman La-Roche, Suiza), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores se normalizan.
- 35 La Fig. 10 demuestra que ARNsi5 no afecta a la viabilidad de células Huh 5-2. Específicamente, ARNm que codifica GAPDH, una enzima esencial para glicolisis se midió en células Huh 5-2 transfectadas con ARNsi5 o ARNsi específico de GAPDH. El gráfico demuestra que ARNsi5 no afectó a los niveles de ARN de GAPDH. GAPDH se midió usando un kit de ARN TaqMan™ (F. Hoffman La-Roche, Suiza), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores se normalizan.
- 40 La Fig. 11 representa una respuesta de dosis de actividad de luciferasa normalizada en células Huh 7 que contienen un replicón de VHC subgenómico (línea 5-2) a las que se administraron diferentes concentraciones de 2'-fluoro-ARNsi (2'-F-GL2), que dirige el gen de luciferasa de la mosca de la fruta. La actividad de luciferasa, que se midió 2 días después de la transfección, cayó con dosis crecientes de ARNsi. El ensayo de luciferasa se realizó usando un kit de Luciferasa Firefly (Promega Corp., Madison, WI), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 45 La Fig. 12 demuestra una inhibición de actividad de luciferasa en células 5-2 usando el ARNsi Col-GL2 en ausencia de liposomas.
- 50 La Fig. 13 demuestra una autoradiografía de duplicaciones de ARNsi etiquetado con 5' separadas por PAGE, y muestra la estabilidad de ARN 2'-fluoro-modificado (2'-F-GL2) incubado en suero humano hasta 10 días. Las duplicaciones de ARNsi se sometieron a incubación con suero humano y se analizaron por 20% PAGE. La composición de las calles es la siguiente: Calle 1, 11 y 21: ARNsi etiquetado con ³²P-extremo solo; Calles, 2-10, 12-20 y 22-25: ARNsi incubado con suero humano. Calles 2 y 12, 1 min.; Calles 3 y 13, 5 min.; Calles 4 y 14, 15 min.; Calles 5 y 15, 30 min.; Calles 6 y 16, 1 hora; Calles 7 y 17, 2 horas; Calles 8 y 18, 4 horas; Calles 9 y 19, 8 horas; Calles 10 y 20, 24 horas; Calles 22, 24 horas; Calles 23, 48 horas; Calles 24, 120 horas; Calles 25, 240 horas de incubación, respectivamente.
- 55 La Fig. 14 demuestra el uso de Dicer humano recombinante para convertir ARNdc fluorizado en 2'-F-ARNsi. La composición de las calles es la siguiente: Calle 1: marcador de tamaño, λ HindIII+ ϕ X174\HaeIII; Calle 2: ribo/ribo homodúplex ARN; Calle 3: ribo/2'-F heterodúplex ARN; Calle 4: 2'-F/ribo heterodúplex ARN; Calle 6: marcador de tamaño, escalera 10bp ADN; Calle 7: ribo/ribo homodúplex ARNsi; Calle 8: ribo/2'-F heterodúplex ARNsi; Calle 9: 2'-F/ribo heterodúplex ARNsi; Calle 10: 2'-F/2'-F homodúplex ARNsi.
- 60

La Fig. 15 muestra una respuesta de dosis de actividad de luciferasa normalizada en células Huh-7 que contienen el replicón de VHC subgenómico (línea 5-2) para ARNs específicos de VHC. La actividad de luciferasa cayó con dosis crecientes de cada ARNsi.

5 La Fig. 16 muestra que el colesterol muestra una respuesta de dosis de actividad de luciferasa normalizada en células Huh-7 que contiene el replicón de VHC subgenómico (línea 5-2) para ARNsi GL2 modificado con colesterol.

10 La Fig. 17 demuestra la mayor estabilidad vista con un ARNsi que se ha modificado para incluir pirimidina 2-Fluoro que sustituyen todas la pirimidinas (2-F-ARNsi) y pirimidinas 2-Fluoro que sustituyen todas la pirimidinas y también una secuencia de dos deoxinucleótidos bases "TT" añadidas a los extremos 30 de la molécula en lugar de los salientes de ribonucleótido "UU" presentes en 2-F-ARNsi (2'-F-ARNsi 3'-X).

15 La Fig. 18 muestra que la estabilidad de ARNsi puede aumentar dramáticamente por la fluorización en 2'-azúcar.

La Fig. 19 muestra la evaluación de ARNsi *in vivo*.

20 La Fig. 20 muestra que el inhibidor de proteasa de molécula pequeña BILN-2061 es eficaz en ratones quiméricos por inyección de baja presión IV.

La Fig. 21 muestra 2'-F-ARNsi conjugado dado por inyección de baja presión IV es prácticamente infectivo en ratones quiméricos.

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona moléculas ARNdc que tienen aproximadamente de 10 a 30 nucleótidos de longitud, y que median la interferencia de ARN en células dianas. Preferentemente, las moléculas inventivas están químicamente modificadas para conferir una mayor estabilidad frente a la degradación de nucleasa, pero mantienen la habilidad para enlazarse a ácidos nucleicos dianas.

30 Como se usa en el presente documento, "ARN de interferencia" (ARNi) se refiere a supresión específico de secuencia o de gen de expresión de gen (síntesis de proteína) que está mediada por ARNi, sin la supresión generalizada de la síntesis de proteína. Mientras la invención no se limita a una teoría o modo de acción particular, ARNi puede implicar la degradación de ARN mensajero (ARNm) por un complejo silenciador inducido por ARN (RISC), previniendo la traslación del ARNm transcrito. Alternativamente, puede implicar la metilación de ADN genómico, que desvía la transcripción de un gen. La supresión de la expresión de gen causada por ARNi puede ser temporal o puede ser más estable, incluso permanente.

40 "Supresión de gen", "supresión dirigida", "supresión específica de secuencia", "ARNi dirigido" y "ARNi específico de secuencia" se usan intercambiamente en el presente documento. Además, la supresión específica de secuencia, como se usa en el presente documento, se determina analizando por separado niveles de la proteína dirigida para la supresión en células que contienen el ARNsi (células experimentales) y en células que no contienen el ARNsi idéntico (células de control), comparando después los dos valores. Las células experimentales y de control deberían derivarse de la misma fuente y el mismo material. También, las células de control y experimentales usadas en la determinación del nivel o cantidad de supresión de gen deberían analizarse bajo condiciones similares, si no idénticas.

50 ARN es un polímero de ribonucleótidos, conteniendo cada uno la ribosa de azúcar en asociación con un grupo fosfato y una base de nitrógeno (típicamente, adenina, guanina, citosina o uracil). Como su primo, ADN, ARN puede formar enlaces complementarios de hidrógeno. Por lo tanto, ARN puede ser de doble cadena (ARNdc), de única cadena (ARNuc) o de doble cadena con un saliente de única cadena. Los tipos comunes de ARN incluyen ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomal (ARNr), ARN corto de interferencia (ARNci), micro ARN (miARN) y ARN de horquilla corta (ARNhc), jugando cada uno un papel específico en células biológicas. Como se usa en el presente documento, el término "ARN" incluye todos estos.

60 "ARN corto de interferencia" (ARNsi) se refiere a moléculas de ARN de doble cadena de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud que son nombradas por su habilidad para interferir específicamente con la expresión de proteína. Preferentemente, las moléculas de ARNsi tienen 12-28 nucleótidos de longitud, más preferentemente 15-25 nucleótidos de longitud, aún más preferentemente 19-23 nucleótidos de longitud y más preferentemente 21-23 nucleótidos de longitud. Por lo tanto, las moléculas ARNsi tienen 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 nucleótidos de longitud.

65 La longitud de la cadena designa la longitud de una molécula de ARNsi. Por ejemplo, un ARNsi que se describe como de 21 ribonucleótidos de longitud (un 21-mer) podría comprender dos cadenas opuestas de ARN que se templan juntas para 19 emparejamientos de bases contiguos. Los dos ribonucleótidos restantes en cada cadena

formarían un “saliente”. Cuando un ARNsi contiene dos cadenas de diferentes longitudes, la más larga de las cadenas designa la longitud de ARNsi. Por ejemplo, un ARNdc que contiene una cadena que tiene 21 nucleótidos de longitud y una segunda cadena que tiene 20 nucleótidos de longitud, constituye un 21-mer.

5 ARNsi que comprenden un saliente son deseables. El saliente puede estar en el extremo 5' o 3' de una cadena. Preferentemente, está en el extremo 3' de la cadena de ARN. La longitud de un saliente puede variar, pero preferentemente tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 bases, y más preferentemente tiene 2 nucleótidos de longitud. Preferentemente, el ARNsi de la presente invención comprende un saliente en 3' de aproximadamente 2 a 4 bases. Más preferentemente, el saliente 3' tiene 2 ribonucleótidos de longitud. Incluso más preferentemente, los 2 ribonucleótidos que comprenden el extremo 3' son uridina (U).

10 ARNsi de la presente invención están diseñados para interactuar con una secuencia ribonucleótido diana, lo que significa que complementan una secuencia diana de manera suficiente como para enlazarse con la secuencia diana. La secuencia diana de ribonucleótido es de virus de hepatitis C (VHC), virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, virus de hepatitis D y virus de hepatitis E.

15 El virus de hepatitis C (VHC) es un virus diana altamente preferente. La Figura 1 y Figura 2 desvelan las secuencias de ácido nucleico para varias moléculas de ARNsi específicas de VHC. Entre las mostradas, ARNsi5, ARNsiC1, ARNsiC2, ARNsi5B1, ARNsi5B2 y ARNsi5B4 han demostrado una actividad particularmente buena, y por lo tanto son muy preferentes. ARNsis al menos 80%, 90% o 95% idénticas a estas altamente preferentes también constituyen parte de la invención.

20 La molécula de ARN puede comprender una secuencia de ribonucleótido al menos 80% idéntica a la secuencia de ribonucleótido de un virus diana. Preferentemente, la molécula ARNsi es al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de ribonucleótido del virus diana. La diana puede ser el genoma viral entero, una transcripción primaria, un marco abierto de lectura, o una parte de estos. Más preferentemente, un ARNsi será 100% idéntico a la secuencia de nucleótido de un virus diana. Sin embargo, las moléculas de ARNsi con inserciones, eliminaciones o mutaciones de un único punto en relación con una diana también pueden ser efectivas. Las herramientas para ayudar al diseño de ARNsi están fácilmente disponibles para el público, por ejemplo, una herramienta de diseño de ARNsi basada en ordenador está disponible en internet en www.dharmacon.com.

25 A modo de ejemplo, un polinucleótido que tiene una secuencia nucleótida al menos 95% “idéntica” a la secuencia nucleótida de referencia significa que la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones de punto por 100 nucleótidos de la secuencia nucleótida de referencia, o una mutación de 1 punto por 20 nucleótidos. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia nucleótida al menos 95% idéntica a una secuencia nucleótida de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia pueden eliminarse o sustituirse por otro nucleótido, o un número de nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia pueden insertarse en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones de terminal 5' o 3' de la secuencia nucleótida de referencia o en cualquier sitio entre estas posiciones de terminal, intercaladas individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia.

30 Como un asunto práctico, si una molécula de ácido nucleico particular es al menos 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a la secuencia de ribonucleótido de un agente diana o virus puede determinarse convencionalmente usando programas de ordenador conocidos tales como el programa Bestfit (Paquete Wisconsin Sequence Analysis, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, Madison, WI). Bestfit usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)) para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencia para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se fijan, por supuesto, de tal manera que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia de ribonucleótido de referencia y que se permitan espacios en homología hasta 5% del número total de ribonucleótidos en la secuencia de referencia.

35 La presente invención también incluye moléculas ARNsi que se han modificado químicamente para conferir una mayor estabilidad frente a la degradación de nucleasa, pero mantienen la habilidad para enlazarse con los ácidos nucleicos dianas que pueden estar presentes en células. En el caso en el que un ARN es específico de virus, ARNsis modificados son capaces de enlazarse con ARNs o ADNs específicos del virus, inactivando de esta manera el virus.

40 Un ARNsi modificado de la presente invención comprende un ribonucleótido modificado, y es resistente a la degradación enzimática, tal como degradación RNasa, mientras mantiene la habilidad para inhibir la réplica viral en una célula que contiene las secuencias de ARN o ADN dianas virales específicas. El ARNsi puede modificarse en cualquier posición de la molécula siempre y cuando el ARNsi modificado se enlace con una secuencia diana y sea resistente a la degradación enzimática. Las modificaciones en el ARNsi pueden ser en la base del nucleótido, es decir, la purina o la pirimidina, la ribosa o el fosfato. Preferentemente, la modificación ocurre en la posición 2' de al menos una ribosa en un ARNsi.

Más específicamente, el ARNsi se modifica en al menos una pirimidina, al menos una purina o una combinación de las mismas. Sin embargo, generalmente todas las pirimidinas (citosina o uracil), o todas las purinas (adenosina o guanina) o una combinación de todas las pirimidina y todas las purinas del ARNsi se modifican. Más preferentemente, las pirimidinas se modifican, y estar pirimidinas son citosina, un derivado de citosina, uracil, un derivado de uracil o una combinación de los mismos. Los ribonucleótidos en una o ambas cadenas del ARNsi pueden modificarse.

Los ribonucleótidos que contienen bases de pirimidina encontrados en ARN (citidina y uridina) pueden modificarse químicamente añadiendo cualquier molécula que inhiba degradación de ARN o ruptura de la base, la ribosa o los fosfatos. Como se ha analizado previamente, la posición 2' de ribosa es un sitio preferente para la modificación. ARNsis 2' modificados tienen una vida media más largo del suero y son resistentes a la degradación, en relación con ARNsis no modificados o ARNs de única cadena, tal como antisentido o ribozima. Los ribonucleótidos de pirimidina 2' modificados pueden formarse mediante un número de métodos diferentes conocidos en la técnica.

Una modificación química preferente es la adición de una molécula del grupo químico haluro a un ribonucleótido de ARNsi. Entre los haluros, flúor es una molécula preferente. Además, del fluoro-, otras fracciones químicas tales como metil-, metoxietil- y propil- pueden añadirse como modificaciones. La modificación más preferente, sin embargo, es la modificación fluoro-, tal como una modificación 2'-fluoro o una modificación 2',2'-fluoro.

De este modo, en una realización preferente de la invención, ARNsi se modifica con la adición de una molécula de flúor al carbono 2' de un ribonucleótido de pirimidina. El ARNsi puede fluorizarse completamente o parcialmente. Por ejemplo, solamente los ribonucleótidos de citosina pueden fluorizarse. Alternativamente, solamente los ribonucleótidos de uracil pueden fluorizarse. En una realización preferente, tanto uracil como citosina están fluorizados. Solamente una cadena, bien sentido o antisentido, de ARNsi puede fluorizarse. Incluso la fluorización parcial 2' de ARNsi da protección contra la degradación nucleolítica. De manera importante, ARNsi 2' fluorizado es no tóxico para las células, un resultado inesperado dado que la química del flúor es normalmente tóxica para organismos vivos.

Además, ARNsis modificados de la presente invención pueden contener modificaciones químicas que inhiben polimerasas virales de ARN. Por ejemplo, ARNsis pueden comprender uno o más nucleósidos que inhiben polimerasas ARN dependientes de ARN viral. Ejemplos de tales nucleósidos y otras modificaciones químicas existen en WO 02/057425, WO 02/057287, WO 02/18404, WO 02/100415, WO 02/32920, WO 01/90121, Patente de Estados Unidos N° 6.063.628 y solicitud publicada de Estados Unidos N° 2002/0019363.

ARNsi puede prepararse en un número de maneras, tal como mediante síntesis química, transcripción de polimerasa T7, o tratando ARN largo de doble cadena (ARNdc) preparado mediante uno de los dos métodos previos con enzima Dicer. La enzima Dicer crea poblaciones mezcladas de ARNdc de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 pares base de longitud de ARNdc que tiene un tamaño de aproximadamente 500 pares base a aproximadamente 1000 pares base. Inesperadamente, Dicer pueden efectivamente partir cadenas modificadas de ARNdc, tal como ARNdc 2'-fluoro modificado. Antes del desarrollo de este método, se pensó previamente que Dicer no sería capaz de partir ARNsi modificado. El método de Dicer de preparar ARNsis puede realizarse usando un Kit de Generación Dicer ARNsi disponible en Gene Therapy Systems (San Diego, CA).

En los métodos para hacer ARNsi, un fragmento de ARNdc puede prepararse mediante síntesis química o traslación in vitro. En una realización, el ARNsi modificado es un ARNsi 2' modificado en el que la modificación es en la posición 2' de al menos un ribonucleótido de dicho ARNsi. La modificación se selecciona del grupo consistente en modificación fluoro-, metil-, metoxietil- y propil-. Preferentemente la modificación fluoro- es una modificación 2'-fluoro o una modificación 2',2'-fluoro. Se modifican las pirimidinas, las purinas o una combinación de las mismas del ARNsi. Más preferentemente, se modifican las pirimidinas, tales como citosina, un derivado de citosina, uracil, un derivado de uracil o una combinación de los mismos. Una o dos cadenas de ARNsi pueden contener uno o más ribonucleótidos modificados.

La invención proporciona además un método para inactivar un agente o virus diana en un paciente mediante la administración al paciente de un ARNdc en una cantidad efectiva para inactivar el agente o virus dirigido. Preferentemente el ARNdc se modifica como se ha descrito anteriormente. La interferencia de ARN hacia un segmento de ADN dirigido en una célula puede conseguirse administrando una molécula de ARN de doble cadena a las células, donde la secuencia de la molécula de ARN de doble cadena corresponde a la secuencia de ribonucleótido del segmento de ADN dirigido. Preferentemente, el ARNdc usado para inducir ARNi dirigido es ARNsi.

Como se usa en el presente documento "segmento de ADN dirigido" se usa para querer decir una secuencia de ADN que codifica, por completo o en parte, un ARNm para una proteína dirigida, incluyendo intrones y exones, donde se desea supresión. El segmento de ADN también puede querer decir una secuencia de ADN que normalmente regula la expresión de la proteína dirigida, incluyendo pero sin limitar al promotor y proteína dirigida.

Además, el segmento de ADN puede o no puede ser una parte del genoma de la célula o puede ser extracromosomal, tal como ADN de plásmido.

5 La presente invención está particularmente dirigida a un método para inactivar un virus en un paciente mediante la administración al paciente de un ARNsi, preferentemente un ARNsi modificado, en una cantidad efectiva para inactivar el virus. El ARNsi tiene preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 ribonucleótidos de longitud, más preferentemente 12-28 ribonucleótidos, más preferentemente 15-25 ribonucleótidos, incluso más preferentemente 19-23 ribonucleótidos y lo más preferentemente 21-13 ribonucleótidos.

10 También, el método para inactivar un virus utiliza preferentemente un ARNsi que está modificado en la posición 2' de al menos un ribonucleótido de dicho ARNsi. El ARNsi puede modificarse con grupos químicos seleccionados del grupo consistente en fluoro-, metil-, metoxietil- y propil-. La modificación fluoro- es la más preferente, y una modificación 2'-fluoro o 2'-2'-fluoro es útil en el método. La modificación puede ser en una pirimidina, una purina o una combinación de las mismas del ARNsi. Más preferentemente se modifican las pirimidinas, tales como citosina, un derivado de citosina, uracil, un derivado de uracil o una combinación de los mismos. En una realización, una cadena del ARNsi contiene al menos un ribonucleótido modificado, mientras en otra realización, ambas cadenas del ARNsi contienen un ribonucleótido modificado.

15 ARNsis útiles en los métodos del tratamiento también se modifican por la unión de colesterol al ARNsi. Tales ligandos son útiles para dirigir la entrega de ARNsi a un virus diana en hepatocitos.

20 El colesterol se une al extremo 5'- o extremo 3'- de una molécula de ARNsi. El colesterol puede unirse a uno o más extremos de ARNsi, incluyendo cualquier combinación de los extremos 5'- y 3'-. De este modo, cuando el colesterol se une solamente a los extremos de una molécula de ARNsi, las moléculas de colesterol pueden unirse en cualquier sitio entre 1 y 4.

25 El resultante colesterol-ARNsi se entrega a hepatocitos en el hígado, proporcionando de este modo medios para entregar ARNsi a su localización dirigida.

30 En un aspecto, el método utiliza un ARNsi preparado (a) identificando una secuencia diana de ribonucleótido en un genoma de virus para designar una ARN de interferencia pequeño (ARNsi) y (b) produciendo un ARNsi que se ha modificado para contener al menos un ribonucleótido modificado. Preferentemente, el ARNsi comprende una molécula de ARN de doble cadena con una primera secuencia de cadena de ribonucleótido correspondiente a una secuencia de ribonucleótido correspondiente a una secuencia diana de ribonucleótido en el virus, y una segunda cadena que comprende una secuencia de ribonucleótido complementaria a la secuencia diana de ribonucleótido. La primera y segunda cadena deberían separar cadenas complementarias que se hibridizan entre sí para formar una molécula de ARN de doble cadena. Además, una o ambas cadenas deberían comprender al menos un ribonucleótido modificado.

35 40 En realizaciones preferentes de la invención, el ARNsi dirige una secuencia de ribonucleótido en el genoma de virus de hepatitis C. La secuencia diana de ribonucleótido comprende una secuencia conservada de ribonucleótido necesaria para la réplica de VHC, y la secuencia conservada de ribonucleótido se selecciona del grupo consistente en 5-región no trasladada (5'-UTR), región 3'-no trasladada (3'-UTR), núcleo y NS3 helicasa. Las moléculas de ARNsi muy preferentes comprenden una secuencia al menos 80% idéntica a aquellas de ARNsi5, ARNsiC1, ARNsiC2, ARNsi5B1, ARNsi5B3 o ARNsi5B4. Los ARNsis pueden estar modificados o no modificados como se ha descrito anteriormente.

45 50 Los métodos para inhibir la réplica de VHC en células positivas para VHC no deberían ser tóxicos para las células, o causar apoptosis en las células tratadas. Preferentemente, la inhibición de réplica de VHC está específicamente diseñada para afectar solamente a la réplica de VHC en las células, de manera que no afecte al crecimiento normal, división o metabolismo. Las células en las que VHC ha demostrado replicar incluyen, aunque no se limitan a, células hepáticas, linfocitos de célula B y linfocitos de célula T. preferentemente, un método para inhibir la réplica de VHC se realiza en células hepáticas.

55 60 De acuerdo con la invención, "células hepáticas" pueden ser de cualquier fuente animal. Además, las células hepáticas pueden estar en cultivo celular, o parte de un tejido, o un órgano, en parte o por completo. La expresión células hepáticas pretende incluir cualquier célula que contenga una célula de hígado normal, anormal o enferma. Ejemplos de células hepáticas incluyen, aunque no se limitan a, célula Kupffer, hepatocitos y células que comprenden un carcinoma hepatocelular. "Célula hepática" no pretende incluir células que forman estructuras diferenciadas dentro del hígado, tales como célula endoteliales que forran vasos sanguíneos. Un tejido u órgano que contiene las células hepáticas pueden estar dentro de un sujeto o pueden someterse a biopsia o extraerse del animal. Además, el tejido puede estar "fresco" porque el tejido se habría extraído recientemente de un sujeto, sin ninguna etapa de conservación entre la escisión y los métodos de la invención actual. Antes de la aplicación de los métodos de la invención actual, el tejido también podría haberse conservado mediante técnicas estándares de preparación de tejido incluyendo, aunque sin limitar, congelación, congelación rápida, envoltura con parafina y

65

fijación de tejido. Además, el tejido también puede ser un xenoinjerto o un isoinjerto o en otro animal huésped. Como se usan en el presente documento, los términos animal y sujeto se usan intercambiamente.

De acuerdo con la invención, "virus de hepatitis C" o "VHC", toma su significado ordinario en la técnica como el de la fecha de la invención. El virus de hepatitis C es un virus ARN de la familia Flaviviridae. Por ejemplo como se usa en el presente documento, VHC incluye, aunque no se limita a genotipos 1-11 (usando el sistema más común de genotipos), con estos genotipos rompiéndose en sub-tipos, algunos de los cuales incluyen, aunque no se limitan a 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 5a, 6a, 7a, 7b, 8a, 8b, 9a, 10a y 11a. Además, aislados de individuos consisten en poblaciones heterogéneas aún muy relacionadas de genomas virales, algunas veces referidos como quasiespecies.

ARNsi puede administrarse a un paciente mediante inyección intravenosa, inyección subcutánea, entrega oral, entrega de liposoma o entrega intranasal. El ARNsi puede después acumularse en un órgano diana del paciente.

El término paciente, como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, preferentemente un mamífero. Más preferentemente el paciente puede ser un primate, incluyendo no humanos y humanos. Los términos sujeto y paciente se usan intercambiamente en el presente documento.

Los tratamientos concebidos por la invención actual pueden usarse para sujetos con una infección viral pre-existente, o para sujetos predispuestos a una infección. Además, los métodos de la invención actual pueden usarse para corregir o compensar anomalías celulares o fisiológicas implicadas al conferir susceptibilidad a infecciones virales en pacientes y/o para aliviar síntomas de una infección viral en pacientes o como una medida preventiva en pacientes.

El método para tratar un paciente que tiene una infección viral implica la administración de composiciones a un sujeto. Como se usa en el presente documento, la composición puede querer decir un compuesto puro, agente o sustancia o una mezcla de dos o más compuestos, agentes o sustancias. Como se usa en el presente documento, los términos agentes, sustancia o compuesto pretenden querer decir una proteína, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, polímero o molécula pequeñas, tal como un fármaco.

En una realización de la invención actual, la composición administrada al sujeto es una composición farmacéutica. Además, la composición farmacéutica puede administrarse oralmente, nasalmente, parenteralmente, intrasistémicamente, intraperitonealmente, tópicamente (como por gotas o parche transdérmico), bucalmente, o como un spray oral o nasal. La entrega intranasal de un virus que causa enfermedades de las vías respiratorias altas, tales como coronavirus o el metapneumovirus, sería un modo de entrega particularmente ventajoso. El término "parenteral", como se usa en el presente documento, se refiere a modos de administración que incluyen inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular e infusión. Las composiciones farmacéuticas como las contempladas por la invención actual pueden incluir un transportador farmacéuticamente aceptable.

"Transportador farmacéuticamente aceptable" incluyen, aunque no se limita a, un sólido, semi-sólido o relleno líquido no tóxico, diluyente, material encapsulador o auxiliar de formulación de cualquier tipo, tales como liposomas.

Una composición farmacéuticamente aceptable de la presente invención para inyección parenteral puede comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles farmacéuticamente aceptables acuosas o no acuosas así como polvos estériles para la reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso. Ejemplos de transportadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos o no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, glicol de propileno, glicol de polietileno y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tal como aceite de oliva), y éteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de revestimiento tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de dispersiones, y por el uso de surfactantes.

Las composiciones de la presente invención también pueden contener adyuvantes tales como, aunque sin limitar a, conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse con la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de los fármacos, es deseable reducir la velocidad de la absorción de inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede llevarse a cabo con el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. El índice de absorción del fármaco depende

después de su índice de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrado parenteralmente se lleva a cabo disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite.

5 Las formas de depósito inyectable se hacen formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción del fármaco con el polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, el índice de liberación del fármaco puede controlarse. Ejemplos de polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables con depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

10 Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro retenedor de bacterias, o incorporando agentes esterilizadores en forma de composiciones estériles sólidas que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

15 Las formas sólidas de dosis para administración oral incluyen, aunque no se limitan a, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas sólidas de dosis, los compuestos activos se mezclan con al menos un excipiente o transportador farmacéuticamente aceptable tal como citrato sódico o fosfato de dicalcio y/o a) rellenos o sustancias para preservar tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y acacia, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes desintegrantes como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, e) agentes retardantes de la solución como parafina, f) aceleradores de absorción como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes como, por ejemplo, alcohol de acetilo y monoestearato de glicerol, h) absorbentes como caolín y arcilla bentonita e i) lubricantes como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, glicoles de polietileno sólidos, sulfato de lauril de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosis también puede comprender agentes amortiguadores.

20 25 30 Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden emplearse como rellenos en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como glicoles de polietileno de alto peso molecular y similares.

35 Las formas sólidas de dosis de comprimidos, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con revestimientos carcasa tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden opcionalmente contener agentes oscurecedores y también pueden ser de una composición que liberan el ingrediente o ingredientes activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de incrustación que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

40 Los compuestos activos también pueden estar en forma micro-encapsulada, si es apropiado, con uno o más excipientes de los anteriormente mencionados.

45 50 Las formas líquidas de dosis para administración oral incluyen, aunque no se limitan a, emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas líquidas de dosis pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica tales como, por ejemplo, agua y otros disolventes, agentes solubilizadores y emulsionantes tales como alcohol de etilo, alcohol de isopropilo, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol de bencilo, benzoato de bencilo, glicol de propileno, 1,3-glicol de butileno, dimetilformamida, aceites (en particular de aceites de semilla de algodón, cacahuate, maíz, germen, oliva, castor y de sésamo), glicerol, alcohol de tetrahidrofurfuril, glicoles de polietileno y ésteres de ácido graso y mezclas de los mismos.

Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y suspensores, agentes endulzantes, saborizantes y aromatizantes.

55 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes suspensores como, por ejemplo, alcoholes de isoestearilo etoxilados, sorbitol de polioxietileno y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

60 65 Alternativamente, la composición puede presurizarse y contener un gas comprimido, tal como nitrógeno o propulsor de gas licuado. El medio propulsor licuado y de hecho la composición total es preferentemente tal que los ingredientes activos no se disuelven en la misma hasta ninguna extensión sustancial. La composición presurizada puede también contener un agente activo de superficie. El agente activo de superficie puede ser un agente activo de superficie no-iónica líquido o sólido o puede ser un agente activo de superficie aniónica sólido. Es preferentes usar el agente activo de superficie aniónica sólido en forma de un a sal de sodio.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en forma de liposomas. Como se conoce en la técnica, los liposomas se derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lípidas. Los liposomas estar formados por cristales líquidos hidratados mono o multi-lamelares que se dispersan en un medio acuoso. Puede usarse cualquier líquido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposoma pueden contener, además de los compuestos de la invención, estabilizantes, conservadores, excipientes, y similares. Los lípidos preferentes son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Prescott, Ed., Meth. Cell Biol. 14:33 et seq (1976)).

Un experto en la técnica apreciará que las cantidades efectivas de los agentes de la invención pueden determinarse empíricamente y pueden emplearse en forma pura o, donde existan tales formas, en forma de sal, éster o profármaco farmacéuticamente aceptable. Una cantidad "terapéuticamente efectiva" de las composiciones inventivas pueden determinarse mediante la prevención o mejora de condiciónese o síntomas adversos de enfermedades, lesiones o trastornos a ser tratados. Los agentes pueden administrarse a un sujeto, que necesite el tratamiento de infección viral, como composiciones farmacéuticas en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Se entenderá que, cuando se administra a un paciente humano, el médico que atienda decidirá el uso total diario de los agentes o composición de la presente invención dentro del alcance del criterio médico sensato. El nivel de dosis específico terapéuticamente efectivo para un paciente particular dependerá de una variedad de factores: el tipo y grado de la respuesta celular y fisiológica a conseguir; actividad del agentes o composición específicos empleados; los agentes o composición específicos empleados; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento de administración, ruta de administración, e índice de excreción del agentes; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el agente específico; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es bien conocido por los expertos en la técnica comenzar con dosis de los agentes a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y gradualmente aumentar las dosis hasta que se consiga el efecto deseado.

La dosificación también puede disponerse en una manera específica para el paciente para proporcionar una concentración predeterminada de los agentes en la sangre, como los determinan las técnicas aceptadas y la rutina en la técnica. De este modo, la dosificación para el paciente puede ajustarse para conseguir niveles regulares de sangre en curso, como lo mide HPLC, en el orden de desde 50 a 1000 ng/ml.

Varias medicaciones pueden reducir los niveles de colesterol en sangre. Estas medicaciones o fármacos incluyen, por ejemplo, estatinas, resinas y ácido nicotínico (niacina), gemfibrozilo y clofibrato. Clofibrato (Atromid-S) eleva los niveles de colesterol HDL y reduce los niveles de triglicérido. Gemfibrozilo (Lopid) reduce las grasas en sangre y eleva los niveles de colesterol HDL.

El ácido nicotínico trabaja en el hígado y se usa para reducir los triglicéridos y el colesterol LDL, y elevar el colesterol HDL ("bueno"). Las resinas promueven la mayor eliminación de colesterol. Las medicaciones en esta clase incluyen: Colestiramina (Questran, Prevalite, Lo-Cholest); Colestipol (Colestid); y Colesevelam (WelChol).

Los fármacos de estatina son muy efectivos para reducir los niveles de colesterol LDL ("malo"), tienen pocos efectos secundarios inmediatos a corto plazo y son un fármaco preferente reductor de colesterol para su uso en los métodos de la presente invención. Las estatinas incluyen: Atorvastatina (Lipitor); Fluvastatina (Lescol); Lovastatina (Mevacor); Pravastatina (Pravachol); Calcio de Rosuvastatina (Crestor); y Simvastatina (Zocor). (Véase también "Reducción del colesterol con fármacos de estatina, riesgo de apoplejía y mortalidad total. Un resumen de ensayos aleatorizados"; Herbert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens, CH. JAMA (1997) Nov. 26; 278(20):1660-1.

HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-conenzima A) reductasa (HMGR) cataliza la etapa cometida en la biosíntesis de colesterol. Las estatinas son inhibidoras de HMGR con valores constantes de inhibición en el rango nanomolar que efectivamente reducen los niveles de colesterol en suero y se pre-escriben comúnmente en el tratamiento de hipercolesterolemia. Los fármacos de estatina aumentan la expresión de receptores de LDL sobre la superficie de hepatocitos del hígado. Como consecuencia del aumento en la expresión del receptor LDL, el nivel de colesterol se reduce en plasma. De este modo, al administrar un fármaco reductor de colesterol, el nivel de colesterol conflictivo en plasma se reduce y el nivel de receptores de LDL para enlazar con colesterol-ARNsi en el hígado aumentan. La invención proporciona de este modo un método para la mayor ingesta de ARNsi etiquetado con colesterol donde el ARNsi se administra en conjunto con un fármaco reductor de colesterol que aumenta la expresión del receptor LDL por lo que el nivel de colesterol conflictivo en el suero se reduce, permitiendo una ingesta más eficiente de ARNsi etiquetado con colesterol por hepatocitos. El fármaco reductor de colesterol puede administrarse antes, con o después de la administración del colesterol-ARNsi.

EJEMPLOS

Los ejemplos demuestran que ARNsi, incluyendo ARNsi modificado, puede inhibir de manera efectiva la réplica viral en células mamíferas. Además, los ejemplos muestran que los ARNsis inventivos promueven la degradación de ARN de VHC en células del hígado humano y establecen que los hepatocitos poseen los componentes funcionales necesarios ARNsi modificado inducido silenciador. Los ejemplos también demuestran que

la tecnología de ARNsi puede usarse como una terapia para inhibir la réplica de VHC en células huéspedes. Los inventores, al presentar los siguientes ejemplos, no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada.

EJEMPLO 1

5 Para analizar si ARNsi dirigido al genoma de VHC confiere inmunidad intracelular contra este patógeno humano, se usó un sistema de cultivo celular de VHC recientemente desarrollado en la línea celular del hepatoma humano, Huh-7. Una de las líneas celulares, 5-2 alberga ARN de VHC subgenómico replicante autónomamente (Bartenschlager, J. *Virology*, 2001). El replicón subgenómico lleva el gen de luciferasa de luciérnaga, permitiendo un
10 ensayo de función del reportero como una medida de réplica de ARN VHC (Fig. 5). Debido a las mutaciones adaptivas del cultivo celular introducidas en el genoma (Bart), estas células 5-2 replican ARN de VHC en niveles de hasta 5×10^4 virus partícula/célula.

15 Usando la transcripción T7, se hicieron varias duplicaciones de 21-bps ARNsi contra diferentes regiones de 5'-UTR del genoma de VHC (Fig. 5). En resumen, se generaron 2 moléculas oligo de ADN de doble cadena que comprendían el promotor T7 y 5'-UTR de VHC orientado a la dirección sentido o dirección antisentido. Cada ADN oligo se transcribió después *in vitro* para producir ARN (+) y (-) y después se trató con ADNasa I para retirar la plantilla de ADN. Las dos cadenas de ARN se dejaron templar a 37 °C durante la noche, generando ARNdc. Después de tratar el ARNdc con ARNasa T1 para retirar especies de ARNs que no reaccionaron, el ARNdc se
20 purificó para transfección.

25 Se diseñaron varias otras duplicaciones de ARNsi, incluyendo GL2 y GL3, que se dirigieron contra los genes de luciferasa de la mosca de la fruta y pensamiento del mar, respectivamente. Usando técnicas estándares de transfección, los ARNs se transfectaron a células 5-2 y se midió la actividad de luciferasa para determinar el efecto de ARNs en réplica de VHC. La actividad de luciferasa se midió 48 horas después de la transfección. En células donde se transfectó ARNsi5, hubo una actividad reducida de luciferasa de hasta el 85%, en una manera sensible a la dosis (Fig. 6). La inhibición de actividad de luciferasa no se vio en células que se transfectaron con ARNsi (SIN) irrelevante. La secuencia de SIN se tomó de promotor de transcripción de virus sindbis (Fig. 1).

30 EJEMPLO 2

La especificidad de secuencia de la respuesta de ARNsi5 se analizó además usando duplicaciones adicionales de ARNsi, GL2 y GL3. La Figura 1 muestra que GL2 y GL3 difieren entre sí por 3 nucleótidos. La actividad de luciferasa se redujo un 90% en células transfectadas con ARNsi5 o GL2, pero no se vio una reducción significativa en células transfectadas con GL3 (Fig. 7). En ensayo de luciferasa se realizó usando un sistema de ensayo de luciferasa disponible en Promega Corp. (Madison, WI), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

EJEMPLO 3

40 Ya fuera ARNsi5 tóxico o no también se analizó para células transfectadas. La toxicidad se midió usando un ensayo de actividad de ATPasa. La Figura 8 muestra que la reducción inducida por ARNsi5 en réplica de VHC, como se ve en la Figura 6, no fue debido a la toxicidad celular que se atribuyó a ARNi específico de no secuencia. Los niveles de ATPasa se analizaron usando un kit de ensayo de ATPasa de Promega (Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

45 EJEMPLO 4

50 El replicón de VHC de longitud completa puede poseer la habilidad para adaptar y suprimir ARNi, replicando de este modo en lugar de la presencia de ARNsi, como lo documenta Li, H, *Science* 296:1319-1321 (2002). Para determinar los efectos de ARNsi5 en la réplica de ARN VHC de longitud completa en células Huh-7, de la línea celular 21-5, que alberga el replicón de VHC seleccionable de longitud completa, se trataron con ARNsi5. Los niveles de ARN VHC se midieron mediante PCR cuantitativo usando TaqMan™ (F. Hoffman La-Roche, Suiza). Los resultados como los vistos en la Figura 9 muestra que el silenciamiento dirigido a ARNsi redujo la producción de ARN viral en estado estacionario, incluso en el escenario de un mutante de VHC adaptado, donde la réplica de ARN fue muy alta. Los resultados de ambos replicones de VHC subgenómicos y de longitud completa sugieren que
55 ninguna de las proteínas de VHC puede suprimir la interferencia de ARN.

EJEMPLO 5

60 Ya fuera ARNsi5 tóxico o no también se analizó para células transfectadas. Específicamente, ARNm que codificaba GAPDH, una enzima esencial en glicólisis, se midió en células Huh 5-2 transfectadas con ARNsi5, o ARNsi específico hacia la secuencia GAPDH. La Figura 10 demuestra que ARNsi5 no afectó a los niveles de ARN de GAPDH. GAPDH se midió usando un kit de ARN TaqMan™ (F. Hoffman La-Roche, Suiza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

65

EJEMPLO 6

Para analizar la efectividad de ARNsi5 en la inhibición de la habilidad de VHC para replicar en un hígado infectado, partes del hígado infectado por VHC se sometieron a xenoinjerto en ratones inmunodeficientes combinados severos transgénicos (SCID) de acuerdo con métodos bien conocidos para el técnico cualificado.

En resumen, una vez que el hígado infectado por VHC suplanta el hígado de un ratón, ARNsi5 encapsulado en liposoma, o liposomas de control se administran mediante inyección intravenosa a los ratones a través de la vena de la cola, u otra vena accesible. A los ratones se les suministra dosis una vez al día durante 3-10 días.

Al final del régimen de dosis los ratones se sacrifican y la sangre se recoge y los hígados se extraen. El hígado se divide en partes de tal manera que una parte se congela usando nitrógeno líquido, una parte se fija a la incrustación de parafina y una parte se fija para seccionar en portaobjetos.

Usando la parcela apropiada, ARN de VHC se cuantifica usando el kit de ensayo de ARN TaqMan™ previamente utilizado en el presente documento para determinar los niveles de ARN de VHC en las células del hígado. Además, los títulos de anticuerpo anti-VHC pueden medirse en las muestras de sangre recogida, junto con los niveles de suero ALT.

EJEMPLO 7

Para evaluar la eficacia de ARNsi5 en la inhibición de la habilidad de VHC para infectar un hígado sano, partes de hígado humano normal se sometieron a xenoinjerto en ratones inmunodeficientes combinados severos transgénicos (SCID) de acuerdo con métodos bien conocidos para el técnico cualificado.

En resumen, una vez que el hígado sano suplanta el hígado de un ratón, ARNsi5 encapsulado en liposoma, o liposomas de control se administran mediante inyección intravenosa a los ratones a través de la vena de la cola, u otra vena accesible. A los ratones se les suministra dosis una vez al día durante 3-10 días. Después del régimen de pre-dosis, VHC activo se inyecta después intravenosamente, o a través de inyección hepática, en los ratones.

Aproximadamente a las 6, 12, 18, 24 horas, y periódicamente hasta aproximadamente 5 días después de que los ratones hayan sido infectados con VHC, los ratones se sacrifican y la sangre se recoge y los hígados se extraen. El hígado se divide en partes de tal manera que una parte se congela usando nitrógeno líquido, una parte se fija a la incrustación de parafina y una parte se fija para seccionar en portaobjetos.

Usando la parcela apropiada, ARN de VHC se cuantifica usando el kit de ensayo de ARN TaqMan™ previamente utilizado en el presente documento para determinar los niveles de ARN de VHC en las células del hígado. Además, los títulos de anticuerpo anti-VHC pueden medirse en las muestras de sangre recogida, junto con los niveles de suero ALT.

EJEMPLO 8

ARNsi modificado puede prepararse mediante síntesis química. En una realización cada C y U dentro de un duplicado ARNsi, por ejemplo, GL2, puede sustituirse por 2'-F-U y 2'-F-C. Para producir ARNsi con salientes en el extremo 3' que comprenden 2'-F-U y 2'-F-C, puede usarse un soporte universal. Partiendo selectivamente el oligo del soporte, un médico puede asegurar que los residuos de los salientes comprenden nucleótidos modificados. Alternativamente, los nucleótidos que comprenden el saliente del extremo 3' puede ser dTdT no modificado.

Los oligonucleótidos de ARN 2'-F pueden sintetizarse en un sintetizador Applied Biosystems 8909 o 8905 ADN/ARN usando el protocolo estándar de química de ARN de fosforamidita beta-cianoetilo de 1 μmol. Los monómeros y columnas de ARN fosforamidita de Pac-A, 2'-F-Ac-C, iPr-Pac-G, 2'-F-7, y U-ANN CPG pueden obtenerse en Glen Research (Sterling, VA). (Véanse catálogos números 1'-3000-05, 10-3415-02, 10-3021-05, 10-3430-02 y 20-3430-41E, respectivamente). El reagente sulfurizante de la investigación de Glen (catálogo números 40-4036-10) puede usarse como un antioxidante para obtener un único eje central de fosforotioato entre el 3' CPG y una base posterior. Para conseguir el enlace, la etapa de oxidación del protocolo estándar de ARN 1 μmol se sustituyó por el protocolo estándar de tioato 1 μmol. Colesteril-TEG fosforamidita (Glen Research, catálogo número 10-1975-90) y colesteril-TEG CPG (Glen Research, catálogo número 20-2975-41E) pueden incorporarse a los extremos 5' y 3' de uno o más oligorribonucleótidos. Después de la síntesis, los 2'-F ARNs se parten y desprotegen con 1:1 hidróxido de amonio/metilamina, y los grupos silil se retiran con trihidrofluro de trietilamina usando protocolos estándares. Véase, por ejemplo, http://www.glenres.com/productfiles/technical/tb_rnadeprotection-pdf. Los oligorribonucleótidos se desalan después en columnas Sephadex G25 (Farmacia NAP 25, catálogo número 17-08252-02) con agua esterilizada y se purifican usando protocolos estándares de electroforesis de gel. Los ARNs modificados también pueden obtenerse de vendedores comerciales tales como Dharmacon (Lafayette, CO).

Alternativamente, ARNsi modificado puede prepararse mediante transcripción usando el Kit de Transcripción Durascribe™ T7 comprado en Epicentre Technologies (Madison, WI).

Los ARNs modificados (ARNdc) hechos mediante estos métodos contienen fosfodiéster unido a oligonucleótidos. Los métodos estándares para hacer ARNs de única cadena modificados, tales como moléculas antisentido, son útiles para hacer ARNs modificados, ya que ARNs de única cadena modificados pueden templarse juntos para formar ARNs de doble cadena. Tales métodos estándares incluyen, aunque no se limitan a, aquellos descritos en Chiang et al., J. Biol. Chem. 266, 18162-18171 (1991); Baker et al., J. Biol. Chem. 272, 11994-12000 (1997); Kawasaki et al., J. Med. Chem. 36, 831-841 (1993); Monia et al., J. Biol. Chem. 268, 14514-14522 (1993).

EJEMPLO 9

Para analizar si ARNsi dirigido al genoma de VHC confiere inmunidad intracelular contra este patógeno humano, se usó un sistema de cultivo celular de VHC recientemente desarrollado en línea celular de hepatoma humano, Huh-7. Una de estas líneas celulares, 5-2, alberga ARN de VHC subgenómico replicante autónomamente (Bartenschlager, J. Virol, 2001). El replicón subgenómico lleva el gen de luciferasa de luciérnaga, permitiendo un ensayo de función del reportero como una medida de réplica de ARN de VHC. Debido a las mutaciones adaptivas del cultivo celular introducidas en el genoma, las células 5-2 replican ARN de VHC en niveles de hasta 5×10^4 virus partícula/célula.

Usando la transcripción T7, se hicieron varias duplicaciones de 21-bps ARNsi contra diferentes regiones de 5'-UTR del genoma de VHC. En resumen, se generaron 2 moléculas oligo de ADN de doble cadena que comprendían el promotor T7 y 5'-UTR de VHC orientado a la dirección sentido o dirección antisentido. Cada ADN oligo se transcribió después *in vitro* para producir ARN (+) y (-) y después se trató con ADNasa I para retirar la plantilla de ADN. Las dos cadenas de ARN se dejaron templar a 37 °C durante la noche, generando ARNdc. Después de tratar el ARNdc con ARNasa T1 para retirar especies de ARNs que no reaccionaron, el ARNdc se purificó para transfección.

Más abajo se proporcionan dos ARNs modificados ejemplares:

```

Chol-GL2  Chol-CGUACGCGGAAUACUUCGAUU
           UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU
GL2       CGUACGCGGAAUACUUCGAUU
           UUGCAUGCGCCUUAUGAAGCU

```

Cada C y U en ARNsi GL2, dirigido contra el gen de luciferasa de la mosca de la fruta, se sustituyó por 2'-F-U y 2'-F-C. Los ARNs modificados se transfectaron a células 5-2 usando técnicas estándares de transfección de liposomas. Específicamente, los ARNs modificados se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una suspensión celular de 250 µl que contenía 0,5 µl de Oligofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA), durante 20 horas en medio de cultivo que contenía 375 µl, y durante 24 horas a 37 °C en medio fresco sin complejo liposoma-ARNsi. La actividad de luciferasa se midió 48 horas después de la transfección para determinar el efecto de los ARNs modificados en la réplica de VHC.

La Figura 11 muestra que GL2 redujo la actividad de luciferasa en concentraciones crecientes. La actividad de luciferasa se redujo un 90% en células transfectadas con 2'-F-GL2, pero no se vio una reducción significativa en células transfectadas de imitación o con un control (2'-F-GFP = proteína verde fluorescente). En ensayo de luciferasa se realizó usando un sistema de ensayo de Luciferasa disponible en Promega Corp. (Madison, WI), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ARNsi Col-GL2 comprende un grupo colesteril en uno de los extremos 5'. Las células 5-2 se incubaron con varias concentraciones de Col-GL2 en ausencia de liposomas. Las células se cosecharon 48 horas después y se analizaron para la actividad de luciferasa. La Figura 12 muestra que Col-GL2 inhibió la actividad del gen de luciferasa en una manera dependiente de dosis. InvA se refiere a col-GL2 en secuencia invertida.

EJEMPLO 10

Para comprobar la estabilidad de ARNsi 2' químicamente modificado en comparación con ARNsi no modificado (ARNsi), se realizó el siguiente experimento. Se añadieron cuatro nanogramos de ARNsi a un volumen de 20 µl de 80% suero humano de un donante sano. La mezcla se incubó a 37 °C durante varios momentos que oscilan entre 1 minuto y 10 días. Los resultados se representan en calles 2-10 de la Figura 13. Se realiza el mismo proceso para ARNsi modificado con 2'-flúor (2'-F ARNsi) también y los resultados se muestran en las calles 11-20 y 22-25 de la Figura 3. Cuando el proceso de incubación se acaba, las mezclas se colocan en hielo y después inmediatamente se separan por PAGE junto con un control 32P-ARNsi (Véase calles 1, 11 y 21 de la Figura 13). Los datos muestran que ARNsi modificado 2' es estable durante un periodo de 10 días en comparación con ARNsi no modificado.

EJEMPLO 11

5 Para demostrar la producción de ARNsi modificado de ARNdc largo, se incubaron cinco nanogramos de ARNdc fluorizado de 1000-bp de longitud (Figura 14, panel (A)) se incubaron durante la noche con 15 unidades de Dicer humano a 37 °C. Los ARNsis troceados se purificaron usando una columna Sephadex G-25 y se sometieron a electroforesis en 20% PAGE (Figura 14, panel (B)). La Figura 4 muestra que el dicer humano recombinante convierte de manera efectiva ARNdc-fluorizado en 2'-F-ARNsi.

EJEMPLO 12

10 Para analizar más si ARNsi dirigido al genoma de VHC confiere inmunidad intracelular contra este patógeno humano, se empleó el ensayo descrito en el Ejemplo 1 para analizar ARNsiC1, ARNsiC2, ARNsi5B1, ARNsi5B2 y ARNsi5B4, mostrándose cada uno de ellos en la Figura 2. Cada ARNsi se analizó en concentraciones de 1 nM, 10nM y 100 nM. Como se muestra en la Figura 15, cada uno de los ARNsis inhibió de manera significativa la actividad de luciferasa en una manera dependiente de dosis. ARNsiC2 mostró una particular efectividad.

EJEMPLO 13

20 Como un seguimiento a los experimentos presentados en el Ejemplo 9, se realizaron ensayos para demostrar que la modificación de colesterol, y no la modificación de flúor se dirigió moléculas de ARNsi a células del hígado Huh-7. Las células Huh-7 se incubaron con varias concentraciones de dos tipos de ARNsis Col-GL2: uno que tenía la modificación 2'-flúor y el otro que carecía de tal modificación. Los resultados, mostrados en la Figura 16 demuestran que la entrega de molécula de ARNsi modificadas con colesterol a células del hígado se debe al colesterol, y no a otras modificaciones.

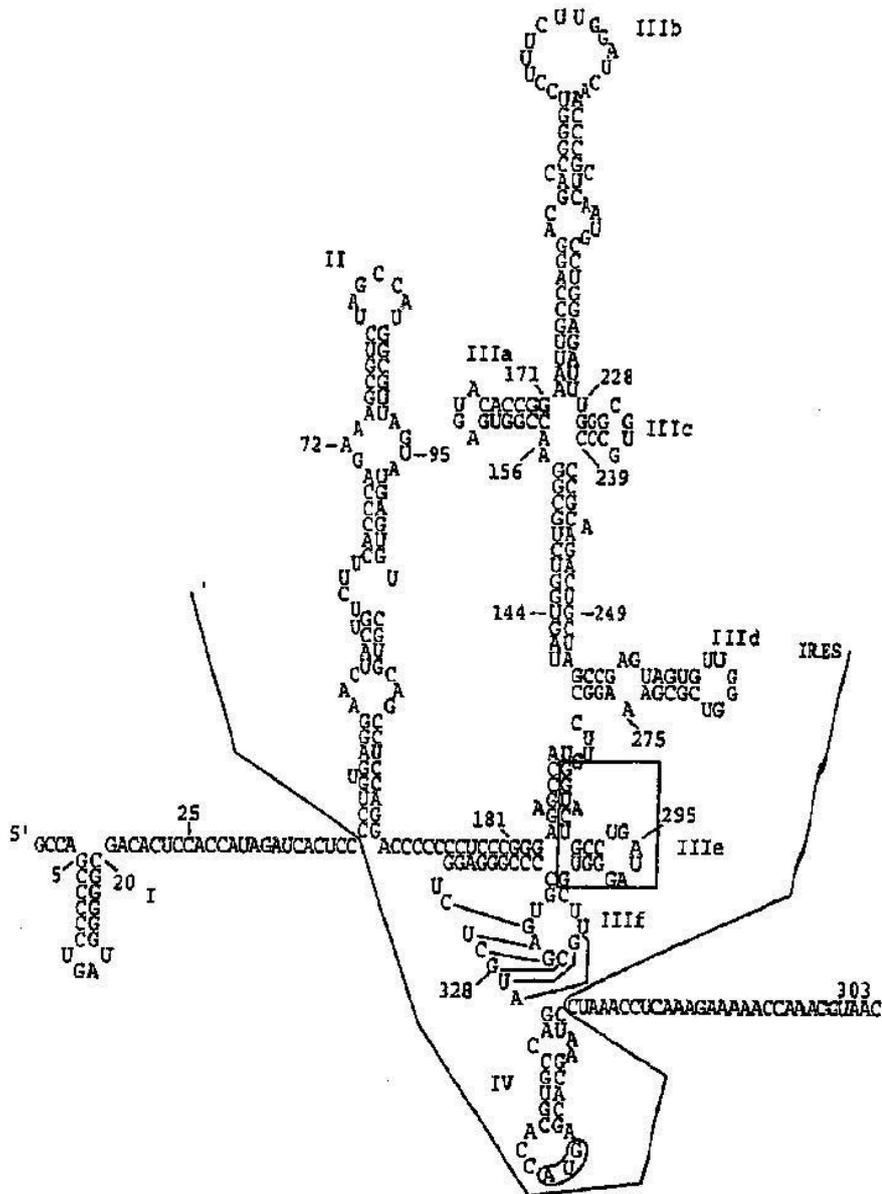
EJEMPLO 14

25 ARNsi se modificó para incluir pirimidinas 2-Flúor en lugar de todas la pirimidinas (2'-F-ARNsi). Este 2'-F-ARNsi se modificó además para incluir una secuencia "TT" de deoxinucleótidos de dos bases añadida a los extremos 3' de la molécula en lugar de los salientes "UU" de ribonucleótido presentes en 2-F-ARNsi (2'-F-ARNsi 3'-X). La Figura 17 demuestra que la modificación adicional del ARNsi 2' fluorizado para incluir una terminal 3'"dTdT" dio como resultado un aumento significativo en la estabilidad del ARNsi en suero humano.

30

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un ARN de doble cadena modificado (ARNdc) o ARN corto de interferencia (ARNsi) que interactúa con una secuencia diana de ribonucleótido de virus de hepatitis C (VHC), virus de hepatitis A, virus de hepatitis B, virus de hepatitis D o virus de hepatitis E, donde dicho ARNdc o ARNsi se une al colesterol, en conjunto con un fármaco reductor de colesterol que es una estatina, resina, gemfibrozilo o clofibrato, para su uso en un método terapéutico para inactivar el virus.
- 10 **2.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 1, donde dicho ARNdc modificado o ARNsi modificado e 2' modificado.
- 3.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 1, donde dicha modificación se selecciona del grupo consistente en modificación fluoro-, metil-, metoxietil- y propil-.
- 15 **4.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 1, donde dicha modificación fluoro- es una modificación 2'-fluoro- o una modificación 2',2'-fluoro.
- 5.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 1, donde al menos una pirimidina de dicho ARNdc o ARNsi se modifica, y dicha pirimidina es citosina, un derivado de citosina, uracil o un derivado de uracil.
- 20 **6.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 1, donde dicho ARNdc o ARNsi comprende una secuencia "TT" de deoxinucleótido de dos bases en su extremo 3'.
- 7.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 1, donde dicho ARNsi se prepara:
- 25 (a) identificando una secuencia diana de nucleótido en un genoma de virus para diseñar un ARN corto de interferencia (ARNsi), y
(b) producir un ARNsi que se ha modificado para contener al menos un nucleótido modificado.
- 8.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 7, donde dicha secuencia diana de nucleótido se selecciona del grupo consistente en región no trasladada 5' (5'-UTR), región no trasladada 3' (3'-UTR), núcleo y helicasa NS3 de VHC.
- 30 **9.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 8, donde dicho ARNsi es ARNsi5, como se representa en la figura 1, o ARNsiC1, ARNsiC2, ARNsi5B1, ARNsi5B2 o ARNsi5B4, como se representa en la figura 2.
- 10.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 1, donde dicho ARNsi consiste en aproximadamente de 10 a aproximadamente 30 ribonucleótidos.
- 40 **11.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 10, donde dicho ARNsi modificado es un ARNsi modificado 2'.
- 12.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 11, donde dicha modificación se selecciona del grupo consistente en modificación fluoro-, metil-, metoxietil- y propil-.
- 45 **13.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 12, donde dicha modificación fluoro- es una modificación 2'-fluoro- o una modificación 2',2'-fluoro.
- 14.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 13, donde al menos una pirimidina de dicho ARNsi se modifica, y dicha pirimidina es citosina, un derivado de citosina, uracil o un derivado de uracil.
- 50 **15.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 10, donde dicho ARNsi comprende una secuencia "TT" de deoxinucleótido de dos bases en su extremo 3'.
- 55 **16.** El ARN modificado y fármaco reductor de colesterol de la reivindicación 10, donde ambas cadenas de dicho ARNsi contienen al menos un nucleótido modificado.
- 60



LA REGIÓN DONDE SE DISEÑARON ARNsis ESTÁ EN UNA CAJA. LA SECUENCIA DEL ARNsi 21-bp SE MUESTRA MÁS ABAJO.

	286	304
siRNA ₅	5' - GUACUGCCUGAUAGGGUGCUU	
	UUCAUGACGGACUAUCCCACG - 5'	
GL2	5' - CGUACGGGAAUACUUCGAUU	
	UUGCAUGCGCCUUUGAAGCU - 5'	
GL3	5' - CUUACGCUGAGUACUUCGAUU	
	UUGAAUGCGACUCAUGAAGCU -- 5'	
SIN	5' - AUCUCUACGGUGGUCCUAUU	
	UUUAGAGAUGCCACCAGGAUU -- 5'	

FIG. 1

	Dominio	Secuencia (NN-N19-NN)	Posición			
508	5' UTR	cc-CUGUGAGGAACUACUGUCU-uc	45-63	Sentido	CUGUGAGGAACUACUGUCUUC	
				Antisentido	AGACAGUAGUUCUACAGGG	
509		ua-CUGUCUUCACGCAGAAAGC-gu	58-76	Sentido	CUGUCUUCACGCAGAAAGCGU	
				Antisentido	GCUUCUGCGUGAAGACAGUA	
5010		cg-AGACUGCUAGCCGAGUAGU-gu	244-462	Sentido	AGACUGCUAGCCGAGUAGUGU	
				Antisentido	ACUACUCGGCUAGCAGUCUCG	
C1		Núcleo	ga-AUCCUAAACCUCAAAGAAA-aa	352-370	Sentido	AUCCUAAACCUCAAAGAAAA
					Antisentido	UUUCUUUGAGGUUAGGAUUC
C2			gg-UCAGAUUCGUCGGUGGAGUU-ua	425-443	Sentido	UCAGAUUCGUCGGUGGAGUUUA
					Antisentido	AACUCCACCGAGGUCUGACC
C3	gg-UAAGGUCAUCGUAUCCUC-ac		701-719	Sentido	UAAGGUCAUCGUAUCCUCAC	
				Antisentido	GAGGUUAUCGUAUCCUACC	
C4	ac-GGCGUGAACUAUGCAACAG-gg		822-840	Sentido	GGCGUGAACUAUGCAACAGGG	
				Antisentido	CUGUUGCAUAGUACCGUUGU	
C5	cc-GGUUGCUCUUUUCUAUCU-uc		852-870	Sentido	GGUUGCUCUUUUCUAUCUUC	
				Antisentido	AGAUAGAAAAGGAGCAACCGG	
5B1	NSSB	gc-UUUUCADACCGAUUCCAAG-ac	8163-8181	Sentido	UUUUCADACCGAUUCCAADAC	
				Antisentido	AUUGGAAUCCGUUUGAAGAGC	
5B2		ca-UACGGAUCCAUAUCUC-cu	8167-8187	Sentido	UACGGAUCCAUAUCUCUCCU	
				Antisentido	GAGAGUAUUGGAAUCCGUUUG	
5B3		uu-UGACUCAACGGUCACUGAG-aa	8270-8288	Sentido	UGACUCAACGGUCACUGAGAA	
				Antisentido	CUACAGUACCGUUGAGUCAAAA	
5B4		cc-UUCACGGAGCCUAUGACUA-ga	8613-8631	Sentido	UUCACGGAGCCUAUGACUAGA	
				Antisentido	UAGUCAUAGCCUCCGUGAAGG	
5B5		au-ACGACUUGGAGUUGAUAAAC-au	8671-8689	Sentido	ACGACUUGGAGUUGAUAAACAU	
				Antisentido	GUUAUCAACUCCAGUCGUAU	
5B6	au-UCCUGGCUAGGCAACAUCA-uc	8817-8835	Sentido	UCCUGGCUAGGCAACAUCAUC		
			Antisentido	UGAUGUUGCCUAGCCAGGAU		
5B7	uu-GUGGCAAGUACCUUCAA-cu	9160-9178	Sentido	GUGGCAAGUACCUUCAAACU		
			Antisentido	UUGAAGAGGUACUUGCCACAA		
5B8	au-GUGGUGCCUACCUACUU-uc	9317-9335	Sentido	GUGGUGCCUACCUACUUUC		
			Antisentido	AAGUAGGAGUAGGCACCACAU		
3U1	3' UTR	cu-UUGGUGGCUCCAUCUAGC-cc	9506-9524	Sentido	UUGGUGGCUCCAUCUAGCCC	
				Antisentido	GCUAAGAUUGGAGCCACCAAAG	
3U2		gu-CACGGCUAGCUGUGAAAGG-uc	9531-9549	Sentido	CACGGCUAGCUGUGAAAGGUC	
				Antisentido	CCUUUCACAGCUAGCCGUGAC	
3U3		ag-CCGCUUGACUGCAGAGAGU-gc	9558-9576	Sentido	CCGCUUGACUGCAGAGAGUGC	
				Antisentido	ACUCUCUGCAGUCAAGCGGCU	

FIG. 2

```

1 ttattaggtt tttacctacc caggaaaagc caaccaacct cgatctcttg tagatctggt
61 ctctaaacga actttaaaat ctgtgtagct gtcgctcggc tgcataccta gtgcacctac
121 gcagtataaa caataataaa ttttactgtc gttgacaaga aacgagtaac tctgtccctct
181 tctgcagact gcttacgggt tctccgtgtg tgcagtcgat catcagcata cctagggttc
241 gtccgggtgt gaccgaaagg taagatggag agccctgttc ttggtgtcaa cgagaaaaca
301 cacgtccaac tcagtttgcc tgtccttcag gttagagacg tgcctagtcg tggcttcggg
361 gactctgtgg aagagggcct atcggaggca cgtgaacacc tcaaaaatgg cacttgtggg
421 ctagttaggc tggaaaaagg cgtactgccc cagcttgaac agccctatgt gttcattaaa
481 cgttctgatg ccttaagcac caatcacggc cacaaggctc ttgagctggg tgcagaaatg
541 gacggcattc agtacggctc tagcggataf acactgggag tactcgtgcc acatgtgggc
601 gaaaccccaa ttgcataccg caatgttctt cttcgtaaag acggtaataa gggagccggt
661 ggtcatagct atggcatcga tctaaagtct tatgacttag tgtacgagct tggcactgat
721 cccattgaag atfatgaaca aaactggaac actaagcatg gcagtgggtc actcgtgaa
781 ctactcgtgt agctcaatgg aggtgcagtc actcgtctatg tcgacaacaa tttctgtggc
841 ccagatgggt accctcttga ttgcatacaa gattttctctg cacgcggggg caagtcaatg
901 tgcactcttt ccgaacaact tgattacatc gagtogaaga gaggtgtcta ctgctgccgt
961 gaccatgagc atgaaattgc ctggttcaact gaggcgtctg ataagagcta cgagcaccag
1021 acaccctctg aaattaagag tgccaagaaa ttfgacactt tcaaaagggg atgcccaag
1081 tttgtgtttc ctcttaactc aaaaagtcaaa gtcattcaac cacgtgttga aaagaaaaag
1141 actgaggggt tcatggggcg tatacgtctt gtgtaccctg ttgcatctcc acaggagtgt
1201 aacaatatgc acttgtctac ctgafgaaa tgtaatcatc gcgatgaagt ttcaggcag
1261 acgtgcgact ttctgaaagc cactgtgaa cattgtggca ctgaaaatft agttattgaa
1321 ggacctacta catgtgggta cctacctact aatgctgtag tgaaaatgcc atgtctgcc
1381 tgtcaagacc cagagattgg acctgagcat agtgttgag aftatcacaa ccactcaaac
1441 attgaaacte gactccgcaa gggaggtagg actagatgtt ttggaggetg tgtgtttgcc
1501 tatgttggtc gctataataa gcgtgcctac tgggttctc gtgctagtgc tgatattggc
1561 tcaggccata ctggcattac tggtgacaat ggggagact tgaatgagga tctccttgag
1621 atactgagtc gtgaacgtgt taacattaac attgttggcg aatgtgagag gaatgaagag
1681 gttgcatca ttttgcatc tttctctgtc tctacaagtg cctttattga cactataaag
1741 agtcttgatt acaagtcttt caaaaccatt gttgagctct gccgtaacta taaagttacc
1801 aagggaaaag ccgtaaaagg tgcttggaac attggacaac agagatcagt ttaacacca
1861 ctgtgtgggt ttccctcaca ggtgtctggt gttatcagat caatftttgc gcgcacactt
1921 gatgcagcaa accactcaat tcttgatttg caaagagcag ctgtcaccat acttgatggt
1981 atttctgaac agtcattacg tcttgtcgac gccatgggtt atacttcaga cctgctcacc
2041 aacagtgtca ttaktatggc atatgtaact ggtggtcttg tacaacagac ttctcagtg
2101 ttgtctaatc ttttgggcac tactgttgaa aaactcaggc ctatctttga atggattgag
2161 gcgaaaacta gtgcaggagt tgaatttctc aaggatgctt gggagattct caaatttctc
2221 atfacagggt tttttgacat cgtcaagggt caaatcagg ttctgtcaga taacatcaag
2281 gatgtgttaa aatgcttcat tgatgttgtt aacaaggcac tggaaatgtg cattgatcaa
2341 gtcactatcg ctggcgcaaa gttgcatca ctcaacttag gtgaagtctt catcgctcaa
2401 agcaagggac tttaccgtca gtgtatacgt ggcaaggagc agctgcaact actcatgect
2461 cttaggcac caaaagaagt aacctttctt gaagggtgatt cacatgacac agtacttacc
2521 totgaggagg ttgtttcaa gaacggtgaa ctogaagcac tgcagacgce cgttgatagc
2581 ttcaaaaatg gagctatcgt cggcacacca gtctgtgtaa atggcctcat gctcttagag
2641 attaaggaca aagaacaata ctggcattg tctcctgggt tactggctac aaacaatgtc
2701 tttcgttaa aaggggtgc accaattaa ggtgtaacct ttggagaaga tactgtttgg
2761 gaagttcaag gtfacaagaa tgtgagaatc acatttgagc ttgatgaacg tgttgacaaa

```

FIG. 3A

```

2821 gtgcttaatg aaaagtgtc tgtctacact gttgaatccg gtaccgaagt tactgagttt
2881 gcatgtgttg tagcagagge tgttgtgaag actttacaac cagtttctga tctcctacc
2941 aacatgggtā ttgatcttga tgagtggagt gtactacat tctacttatt tgatgatgct
3001 ggtgaagaaa acftttcafc acgtatgtat tgttcccttt accctccaga tgaggaagaa
3061 gaggacgatg cagagtgtga ggaagaagaa attgatgaaa cctgtgaaca tgagtacggt
3121 acagaggatg attatcaagg tctcctctg gaatttggtg cctcagctga aacagttcga
3181 gttgaggaag aagaagagga agactggctg gatgatacta ctgagcaafc agagattgag
3241 ccagaaccag aacctacacc tgaagaacca gttaatcagt ttactggtta tftaaactt
3301 actgacaatg ttgccattaa atgtgttgac atcgttaagg aggcacāaaq tgctaactct
3361 atggtgattg taaatgctgc taacatcac ctgaaacatg gtgggtggtg agcaggtgca
3421 ctcaacaagg caaccaatgg tgccatgcaa aaggagagtg atgattacat taagctaat
3481 ggccctctta cagtaggagg gtcttgtttg ctftctggac ataactctgc taagaagtgt
3541 ctgcatggtg ttggacctaa cctaaatgca ggtgaggaca tccagcttct taaggcagca
3601 tafgaaaatf tcaattcaca ggacatctta ctgtcaccat tgttgtcagc aggcataftt
3661 ggtgctaaac cacttcagtc ttacaagtg tgcgtgcaga cggttcgtac acaggttat
3721 attgcagtcā atgacaaagc tctttatgag caggttgtca tggattatct tgalaaactg
3781 aagcctagag tggaaagcacc tggaagcacc taacaagag gagccaccaā acacagaaga tftccaaact
3841 gaggagaaat ctgtcgtaca gaagcctgtc gatgtgaagc caaaaatāaa ggccctgcat
3901 gatgaggtta ccācaācact ggaagaact aagtftctta ccaataagtt actcttgttt
3961 gctgatctca atggtāagct taccatgat tctcagaaca tctgttagagg tcaagafatg
4021 tctttccttg aqaaggatgc acctacatg gtagggtgat ttatcactag tgggtatctc
4081 acttgtgttg tāatāccctc caaaaaggct ggtggcactā ctgagatgct ctcaagagct
4141 ttgaagaaag tgccagtga tgagtatata accacgtacc ctggācaagg atgtgtggt
4201 tatacacttg aggaagctāā gactgctctt aagaaatgca aatctgcatt ttatgtacta
4261 ccttcagaag cācctāatgc tāaggaagag atcttaggaa ctgtatcctg gaattgaga
4321 gaaatgcttg ctcatgctga agagacaaga aaatāatgc ctatātgcā tcaagafatg
4381 gccataatgg caaccatcca acgtaagtat aaaggaatfa aatācaaga ggcātctgt
4441 gactatggtg tccgattctt ctfttafact agtāāagagc ctgtagcttc tāttattācg
4501 aagctgaact ctctāaatga gccgcttgtc acaatgccāā ttggttatgt gacacatggt
4561 tftaatcttg aagaggctgc gctgtatg tcaacagat cacttctgtc cgtagtgtca
4621 gtatcātcc cagtgtgtg tactacatā tcaagatacc tcaactctgc tcaagaca
4681 tctgagcāgc ctcttgtaga aacagtcttct ttggtggct cttacagaga ttggtcctat
4741 tcaggacāgc gtacagagt t aggtgttgāā tttcttāagc gtggtgācāā aatgtgtac
4801 cacactctgg āgagcccgt caggttctat cttgacggtg aggttcttct acttgācāāā
4861 ctāāagagtc tcttatccct gccggagggt aagactāāā aagtgttcaē aactgtggac
4921 aacactāatc tccacacaca gcttgtggt atgtctatga cātāfggāā gcagttgggt
4981 ccaactctā tggatggtgc tggatgtāca āāāatāāā ctcatgtāāā tcaaggggt
5041 aagactttct ttgtactacc tagtgatgac acactacgta gtgaagcttt cgagtactāc
5101 cāfactcttg atgagagtt tcttggtagg tācatgtctg ctftāāacca cācāāgāāā
5161 tggāāatct ctcaagtgg tggttāact tcaatāāā gggctgāāā cāatgttat
5221 ttgtctagt ttttatāgē acttcaacag cttgaagtca āātcaatgc accagcactt
5281 caāgagctt attatagagē ccgtgctggt gatgctgctā actttgtgē actcāactc
5341 gctfacagta atāāāactgt tggcagctt ggtgatgtca gagāāactat gaccatctt
5401 ctacagcāt gctāattgga āctgcaāāg cgagtctta atgtggtgtg tāācattgt
5461 ggtcagāāā ctactacctt āācgggtgta gaagctgtga tgfātātggt tactctatct
5521 tātgāāāā ttaāgacagg tgtttcāat ccatgtgtg tgggtcgtgā tgctacācāā
5581 tāctagtāc āācāāagct tcttttgtt atgatgtctg caccacctgc tgagtāāāā
5641 ttacagcāā gctacatctt atgtgcaat gagtacactg gtaactatca gttgtggtcat
5701 tācāctāāā tāactgctāā ggagacctc tāctgtattg acggagctca cctācāāāg
5761 atgtcagagt ācāāāggacc agtgactgat gttttctācā aggāāācāc ttactācā
5821 accatcāāg ctgtgtcgtā tāāactcāt ggagtactt ācācāgāgāt tgaaccāāāā
5881 ttggatgggt atāāāāāā ggāāāātgct factācācāg āgcāgctat āgaccttgtā
5941 cāāctcāāc cāttācāāā tgcagttt gāāāāāāā āactcācāt tctāācācā
6001 āāāttgtct atgāttāāā tcaāāāgāc gcttcaāā āgccagctc ācgāgācācā
6061 tctgtcācāt tcttccāgā cttgāāāggē gatgtagtgg ctāttgācā tāgācācāt
6121 tcāgctgaggt tcaāgāāāgg tgcāāāāā ctgcāāāgē cāāttgtttg gcācāāāāc

```

FIG. 3B

```

6181 caggetacaa ccaagacaac gttcaaaacca aacacttggt gtttacggtg tctttggagt
6241 acaaagccag tagafacttc aaattcattt gaagttctgg cagtagaaga cacacaagga
6301 atggacaatc ttgcttgtga aagtcaacaa cccacctctg aagaagtagt ggaaaatcct
6361 accatacaga aggaagtcac agagtgtgac gtgaaaacta ccgaagttgt aggcaatgtc
6421 atacttaaac catcagatga aggtgttaa gtacacaag agttaggtca tgaggatctt
6481 atggctgctt atgtggaaaa cacaaagcact accattaaga aacctaatga gctttcacta
6541 gccttaggtt taaaaacaat tgccactcat ggtattgctg caattaatag tgttcttgg
6601 agtaaaaatt tggcttatgt caaacattc ttaggacaag cagcaattac aacatcaaaf
6661 tgcgctaaga gattagcaca acgtgtgttt aacaattata tgcttatgt gtttacatta
6721 ttgttccaat tgtgtacttt tactaaaagt accaattcta gaattagage ttactacct
6781 acaactattg ctaaaaatag tgttaagagt gttgctaat tatgtttgga tgccggcatt
6841 aattatgtga agtcacccaa aitttctaaa ttgttcacaa tcgctatgtg gctatfgttg
6901 ttaagtatct gcttaggttc tctaactgt gtactgctg ctfttggtgt actcttatct
6961 aattttgggt ctcttttta ttgtaatggc gttagagaat tgtatcttaa ttctgtaac
7021 gttactacta tggatttctg tgaaggtct tttcttgca gcatttgttt aagtggatta
7081 gactcccttg attcttatcc agctctttaa accattcagg tgacgatttc atcgtacaag
7141 ctagacttga caattttagg tctggcgcct gagtgggttt tggcatatat gttgttcaca
7201 aaattctttt atttattagg tctttcaget ataatgcagg tgttctttgg ctatftttgct
7261 agtcatttca tcagcaattc ttggctcatg tggtttatca ttagtattgt acaaatggca
7321 cccgtttctg caalggttag gatgtacac ttctttgctt ctftctacta catatgggag
7381 agctatgttc atatcatgga tggttgcacc tcttcgactt gcatgatgtg ctataagcgc
7441 aatcgtgcc aacgcgttga gtgtacaact attgttaatg gcatgaagag atctttctat
7501 gtctatgcaa atggaggccg tggcttctgc aagactcaca attggaattg tctcaattgt
7561 gacacatttt gcactggtag tacattcatt agtgatgaag ttgctcgtga tttgtcactc
7621 cagtttaaaa gaccaatcaa cctactgac cagtcactgt atattgttga tagtgttgt
7681 gtgaaaaatg gcgcgcttca cctctacttt gacaaggctg gtcaaaagac ctatgagaga
7741 catccgctct cccattttgt caatttagac aatttgagag ctaacaacac taaaggttca
7801 ctgctfatta atgtcatagt tttgatggc aagtcctaat ggcacgagtc tgctfctaa
7861 tctgcttctg tgfactacag tcagtgatg tgccaacct a tctgttgcct tgaccaagct
7921 cttgtatcag acgttggaga tagtactgaa gtttccgtta agatgtttga tgcttatgtc
7981 gacacctttf cagcaactft tagtgttct atggaaaaac ttaaggcact tgttgcata
8041 gctcacagcg agttagcaaa ggggtgagct ttagatgggt tectttctac atcgtgtca
8101 gctgcccagc aagggtttgt tgatacagat gttgacacaa aggatgttat tgaatgtctc
8161 aaactttcac atcactctga cttagaagtg acagtgaca gttgtaacaa tttcatgctc
8221 acctataata aggttgaaaa catgacgccc agagatcttg ggcgatgtat tgactgfaat
8281 gcaaggcata tcaatgccc agtagcaaaa agtcacaatg tttcactcat ctggaatgta
8341 aaagactaca tgtctttatc tgaacagctg cgtaaacaaa ttcgtagtgc tgccaagaag
8401 aacaacatac cttttagact aactgtgct acaactagac aggttgtcaa tgcataact
8461 actaaaatct cactcaaggg tgtaagatt gttagtactt gttttaaact tatgttaag
8521 gccacattat tgtgcgttct tgctgcattg gtttgttata tctgtatgcc agtataca
8581 ttgtcaatcc atgatggta cacaaatgaa atcaftggtt acaaagccat tcaggatggt
8641 gtcactcgtg acatcafttc tactgatgat tgttttgcaa ataaacatgc tggftttgac
8701 gcatggttta gccagcgtgg tggttcatac aaaaatgaca aaagctgcc tgtagtact
8761 gctatcatta caagagagat tggtttcata gtgctggct taccgggtac tgtgtgaga
8821 gcaatcaatg gtgacttctt gcattttcta cctcgtggtt ttagtgtgt tggcaacatt
8881 tgcacacac ctccaaact cattgagat agtgattttg ctacctctg ttgcgttctt
8941 gctgctgagt gtacaatttt taaggatgct atgggcaaac ctgtgccata ttgttatgac
9001 actaatttgc tagagggttc tatftcttat agtgagcttc gtccagacac tcttatgtg
9061 cttatggaag gtccatcat acagtttctt aacacttacc tggagggttc tgttagagta
9121 gtaacaactt ttgatgctga gfactgtaga catggtacat gccaaaggtc agaagtaggt
9181 atttgctat ctaccagtgg tagatgggt ttaataatg agcattacag agctctatca
9301 caacctggtg gtgctttaga tgfgtctgct tcagtagtgg ctggtggtat tattgccata
9361 ttggtgactt gtgctgctca ctactttatg aaattcagac gttttttgg tgagtacaac
9421 catgttgttg ctgctaatgc acttttgttt ttgtattctt tcactatact ctgtctggta
9481 ccagctfaca gctttctgcc gggagcttac tcagtctttt acttgaactt gacattctat

```

FIG. 3C

```

9541 ttcaccaatg atgtttcatt cttggctcac cttcaatggt ttgccatggt ttctectatt
9601 gtgccttttt ggataacagc aatctatgta ttctgtaftt ctctgaagca ctgccattgg
9661 ttctttaaca actatcttag gaaaagagtc atgttlaatg gagtfacatt tagtaccttc
9721 gaggaggctg ctttgtgtac ctttttgcct aacaaggaaa tqtacctaaa atttgcgtagc
9781 gagacactgt tgccacttac acagtataac aggtatcttg ctctatataa caagtacaag
9841 tafttcagtg gagccttaga tactaccagg taicgtgaag cagcttgctg ccacttagca
9901 aaggctctaa atgacttttag caactcaggt gctgatgttc tctaccaacc accacagaca
9961 tcaatcactt ctgctgttct gcagagtggg tttaggaaaa tggcattccc gtcaggcaaa
10021 gttgaagggt gcatggtaca agtaacctgt ggaactacaa ctcttaatgg atttgggttg
10081 gatgacacag tatactgtcc aagacatgtc atttgcacag cagaagacat gcttaatcct
10141 aactatgaag atctgctcat tcgcaaatcc aacctatgct ttcttcttca ggtgggcaat
10201 gttcaacttc gtgttattgg ccattctatg caaaattgtc tgcttaggct taaagtgtat
10261 acttctaacc ctaagacacc caagtataaa ttgtccgta tccaacctgg tcaaacattt
10321 tcagttctag catgctacaa tggttcacca tctgggtgtt atcagtgctg catgagacct
10381 aatcatacca ttaaagggtc ttctctaat ggatcatgtg gtagtgttgg ttftaacatt
10441 gattatgatt gcgtgtcttt ctgctatatg cagcatatgg agcttccaac aggtatcac
10501 gctggctactg acttagaagg taaatctat ggtccatttg ttgacagaca aactgcacag
10561 gctgcaggta cagacacaac cataacatta aatgttttgg cafggctgta tctgctgttt
10621 atcaatggtg atagggtgtt tettaataga ttaccacta ctttgaatga ctttaacctt
10681 gtggcaatga agtacaacta tgaacctttg acacaagatc atgttgacat attgggacct
10741 ctftctgctc aaacaggaat tgccgtctta gatatgtgtg ctgctttgaa agagctgctg
10801 cagaatggta tgaatggctg tactatcctt ggtagcacta ttttagaaga tgagtttaca
10861 ccatttgatg ttgttagaca atgctctggt gttaccttcc aaggtaagtt caagaaaatt
10921 gttaaaggga ctcatcattg gatgctttta actttcttga cafcactatt gatcttgtt
10981 caaagtacac agtggctcact gttttctttt gtttacgaga atgctttctt gccatttact
11041 cttggtatta tggcaattgc tgcattgtct atgctgcttg ttaagcataa gcacgcatte
11101 ttgtgcttgt ttctgttacc ttctcttga acagttgctt acttfaatat ggtctacatg
11161 cctgctagct ggtgatgctg tatcatgaca tggcttgaat tggctgacac tagcttgtct
11221 ggttatagge ttaaggattg tgttatgta gcttcagctt tagttttgct taftctcatg
11281 acagctggca ctgtttatga tgatgctgat agacgtgttt ggacactgat gaatgtctat
11341 acacttgttt acaaagtcta ctatggtaat gctttagatc aagctatttc catgtgggct
11401 ttagttattt ctgtaacctc taactattct ggtgtctgta cgaactatcat gtttttagct
11461 agagctatag tgtttgtgtg tgttgagtat taccattgtt tatttattac tggcaacacc
11521 ttacagtgtt tcatgcttgt ttattgttct ttaggctatt gttgctgctg ctactttggtc
11581 cttttctggt tactcaaccg ttacttcagg cttaactctg cttactcttg tggtttatga ctacttggct
11641 ttacacaag aatttaggta tatgaactcc caggggcttt tgcctectaa gactagfatt
11701 gatgctttca agcttaacat taagttgttg ggtattggag gtaaaccatg tafcaaggtt
11761 gctactgtac agtctaaaat gctgacgta aagtgcacat ctgtggtact gctctcggtt
11821 cttcaacaac tttagagtaga gtcatcttct aaattgtggg cacaatgtgt acaactccac
11881 aatgataatc ttcttgcaaa agacacaact gaagctttcg agaagatggt ttctctttg
11941 tctgttttgc tatecatgca ggtgctgtga gacattaata ggttgtgca ggaatgctc
12001 gataaccgtg ctactcttca ggtattgct tcaagaattta gttctttacc atcatatgcc
12061 gcttatgcca ctgccagga ggctatgag caggctgtag ctaatggtga ttctgaagtc
12121 gttctcaaaa agttaaagaa atctttgaaat gtggctaaat ctgagtttga ccgtgatgct
12181 gccatgcaac gcaagttgga aaagatggca gatcaggcta tgacccaaat gtacaaacag
12241 gcaagatctg aggacaagag gcaaaaagta actagtgcta tgcaacaat gctcttcact
12301 atgcttagga agcttgataa tgatgcactt aacaacatta tcaacaatgc gcgtgatggt
12361 tgtgttccac tcaacatcat accattgact acagcagcca aactcatggt tgttgtctct
12421 gattatggta cctacaagaa cacttgtgat ggtaacacct ttacatagc atctgcactc
12481 tgggaaatcc agcaagtgtt tgatgctgat agcaagattg ttcaacttag tgaaat tac
12541 atggacaatt caccaaatft ggttggct ctatgttga cagctetaag agccaactca
12601 gctgttaaac tacagaataa tgaactgagt ccagtgcac tacgacagat gtctgtgctg
12661 gctggtacca cacaaacagc ttgtactgat gacaatgcac ttgctacta taacaatctg
12721 aagggaggta ggtttgtgct ggcattacta fcagaccacc aagatctcaa atgggctaga
12781 ttccctaaga gfgatggtac aggtacaatt tacacagaac tggaccacc ttgtaggttt
12841 gttacagaca cacaaaagg gctaaagt aaatactgt acttcatcaa aggtcaaac

```

FIG. 3D

```

12901 aacctaaata gaggtatggt gctgggcagt ttagctgcta cagtacgtct tcaggetgga
12961 aatgctacag aagtacctgc caattcaact gtgctttcct tctgtgcttt tgcagtagac
13021 cctgctaaag catataagga ttacctagca agtggaggac aaccaatcac caactgtgtg
13141 aagatgttgt gtacacacac tggtacagga caggcaatta ctgtaacacc agaagctaac
13201 atggaccaag agtcccttgg tgggtgttca tgfittgtct attgtagatg ccacattgac
13261 calccaaatc ctaaaggatt ctgtgacttg aaaggtaagt acgtccaaat acctaccact
13261 tgtgetaatg acccagtggg ttttacctt agaaacacag tctgtaccgt ctgcggaatg
13321 tggaaagggt atggctgtag ttgtgaccaa ctccgcgaac ccttgatgca gtctgcggt
13381 gcatcaacgt ttttaaacgg gtttgcggtg taagtgcagc ccgtgttaca ccgtgcgga
13441 caggcactag tactgatgtc gtctacaggg cttttgatat ttacaacgaa aaagtgtctg
13501 gttttgcaaa gttcctaaaa actaattgct gtctgttcca ggagaaggat ccaatggtatg
13561 atttattaga ctctacttt gtagttaaga ggcatactat gtcfaactac caacatgaaag
13621 agactattfa taacttggtt aaagattgtc cagcggttgc tgtccatgac ttttcaagt
13681 tfagagtaga tgggtacatg gtaccacata tatcacgtca cgtctaaact aaatacacaa
13741 tggctgatft agtctatgct ctacgtcatt ttgatgaggg taatttgtat acattaaaag
13801 aaatacctgt cacatacaat tctgtgtatg atgaltatft caataagaag gattggtatg
13861 acttcgtaga gaatcctgac atcttacgct tataggctaa cttagggtgag cgtgtaccgc
13921 aatcattatt aaagactgta caattctgct atgctatgct tgatgcaggc attgtaggcg
13981 tactgacatt agataatcag gatcttaatg ggaactggta cgatctcggt gatftcgtac
14041 aagtagcacc aggtcgcgga gttcctattg tggattcata tfactcattg ctgatgccca
14101 tctcactttt gactagggca ttggctgctg agtcccatat ggatgctgat ctcgcaaac
14161 cacttattaa gtgggatttg ctgaaatag attttacgga agagagactt tgtctcttcg
14221 accgttattt taaaatattg gaccagacat accatccc aa tgfattaac tgtttggatg
14281 ataggtgtat ccttcattgt gcaaaactta atgtgttatt ttctactgtg tttccacctt
14341 caagttttgg accactagta agaaaaat ttgtagatgg tgttctttt gttgtttcaa
14401 ctggatacca ttttcgtgag ttaggagtct tacataatca ggatgtaaac ttacatgct
14461 cgcgtctcag tttcaaggaa cttttagtgt atgctgctga tccagctatg catgcaagct
14521 ctggcaattt attgctatgat aaacgcacta catgcttttc agtagctgca ctaacaaaca
14581 atgtttgctt tcaaactgtc aaaccggta attttaataa agactttfat gactttgctg
14641 tgtctaaagg tttctttaag gaaggaagt ctggtgaact aaaacacttg ttctttgctc
14701 aggatggcaa cgctgctatc agtgattatg actattatcg ttataatctg ccaacaatgt
14761 gtgatatcag acaactccta ttcgtagtgt aagttgttga taaactcttt gatgtttacg
14821 atggtggctg tattaatgcc aaccaagtaa tctgtaacaa tctggataaa tcaagctggtt
14881 tcccafttaa taaatggggt aaggctagac ttfattatga ctcaatgagt tatgaggatc
14941 aagatgcact tttcgcgtat actaaacgta atgtcatccc tactataact caaatgaaac
15001 ttaagfatgc cattagtgca aagaatagag ctccaccgt agctggtgct tctatctgta
15061 gtacfatgac aaatagacag tttcatcaga aattattgaa gtcfaatagcc gccactgagag
15121 gagctactgt ggtaattggg acaagcaagt tttacggctg ctggcataat atgttaaaaa
15181 ctggttacag tgatgtagaa actccacacc ttatgggttg ggalatcca aaatgtgaca
15241 gagccatgcc taacatgctt aggataatgg cctctcttgt tcttgctcgc aaacataaca
15301 ctgctgftaa cttatcacac cgtttctaca ggtagctaa cgagtggtgc caagtattaa
15361 gtgagatggt catgtgtggc ggctcaactat atgttaaac aggfgaaca tcatccggtg
15421 atgctacaac tgcttatgct aatagtgtct ttaacattg tcaagctggt acagccaatg
15481 taaatgcact tctttcaact gatggttaata agatagetga caagfatgct cgaatctac
15541 aacacaggct ctatgagtgt ctctatagaa atagggatgt tgatcatgaa ttcgtggatg
15601 agttttacgc ttacctgctt aaacatttct ccatgatgat tctttctgat gatgccgtt
15661 tgtgtataaa cagtaactat gcggtcraag gtttagttag tagcattaag aactttaagg
15721 cagttcttta ttatcaaaat aatgtgttca tgtctgagge aaaatggttg actgagactg
15781 acctactaa aggacctcac gaattttgct cacagcafac aatgctagt aaacaaggag
15841 atgattacgt gtacctgctt facccagatc catcaagaat attagcgca ggctgttttg
15901 tcatgatgat tgtcaaaaca gatggtacac ttatgattga aaggttcgtg tcaactggcta
15961 ttgatgctta cccacttaca aaacatccta atcaggagta tgcctgatgt tttcacttgt
16021 atttacaata cattagaaag ttacatgat agcttactgg ccacatgttg gacatgtatt
16081 ccgtaatgct aactaatgat aacacctcac ggtactggga acctgagttt fatgaggcta
16141 tgtaacacacc actacagtc ttgcaggctg taggtgcttg tgtattgtgc aatfcacaga
16201 ctteactteg ttgcggtgcc tgtattagga gaccattcct atgttgcaag tgcctgatg

```

FIG. 3E

```

16261 accatgtcat ttcaacatca cacaaattag tgttgtctgt taatecctat gtttgcaatg
16321 ccccaggttg tgatgtcact gatgtgacac aactgtatct aggaggtatg agctattatt
16381 gcaagtcaca taagcctccc attagttttc cattatgtgc taatggtcag gtttttggtc
16441 tatacaaaaa cacatgtgta ggcagtgaca atgtcactga cttcaatgcg acagcaacat
16501 gtgattggac taatgctggc gattacatac ttgccaacac ttgtactgag agactaccgc
16561 ttttcgcagc agaaaagctc aaagccactg aggaaacatt taagctgtca tatggtatfg
16621 ccaactgtacg cgaagtactc tctgacagag aattgcatct ttcattgggag gttggaaaac
16681 ctgaccacc attgaacaga aactatgtct ttactggtta ccgtgtaact aaaaatagta
16741 aagtacagat tggagagtac acctttgaaa aagggtgacta tgggtgatgct gttgtgtaca
16801 gaggtactac gacatacaag ttgaatggtg gtgattactt tgtgttgaca tctcacactg
16861 faatgccact tagtgacct actctagtgc cacaaagaca ctafgtgaga attactggct
16921 tgaaccacac actcaacatc tcagatgagt tttctagcaa tgttgcaaat tatcaaaagg
16981 tcggcatgca aaagtactct acactccaag gaccacctgg tactggtaag agtcattttg
17041 ccatcggact tgcctctctat taccatctg ctgcgatagt gtatacggca tgctctcatg
17101 cagctgttga tgccctatgt gaaaaggcat taaaatatft gcccatagat aaatgtagta
17161 gaatcatacc tgcgctgctg cgctgtagagt gttttgataa attcaaagtg aaatgtagta
17221 tagaacagta tgtttctgct actgtaaatg cattgccaga aacaactgct gacatgtfag
17281 tctttgatga aatctctatg gctactaatt atgacttgag tgttgtcaat gctagacttc
17341 gtgcaaaaaa ctactctatf attggcgatc ctgctcaatt accagcccc ccgacat tgc
17401 tgactaaagg cacactagaa ccagaatatt ttaatcagt gtgcagactt atgaaaaaa
17461 aatagggct tgtaagagaa tttcttacac gcaatcctgc ttggagaaa gctgttttta
17521 tgagtgcttt agtttatgac aataagctaa aagcacacaa ggataagtca gctcaatgct
17581 tcaaaatggt ctacaaaggt gtatttacac atgatgttcc atctgcaatc aacagacctc
17641 ataggtgat ccttcatgt gcaaacctta atgtgttatt ttctactgtg tttccacct
17701 tctcacctta taattcacag aacgtgttag ctcaaaaat cttaggatg cctacgcaga
17761 ctgttgatc atcacagggt tctgaatag actatgtcat attcacaca actactgaaa
17821 cagcacactc ttgtaatgct aaccgcttca atgtgtgat atgacaaact cacaaggca aaaaatggca
17881 ttttgtgcat aatgtctgat agagatcttt atgacaaact gcaatftaca agtctagaaa
17941 taccacgtcg caatgtggct acattacaag cagaaaatgt aactggactt tftaaggact
18001 gtagtaagaf cattactggc ctctcatcct caacaggcac tacacacctc agcgttgata
18061 taaagttcaa gactgaagga ttatgtgtg acataaccagg cataccaaag gacatgacct
18121 accgtagact catctctatg atgggttca aatgaatfa ccaagcttca ggttacctc
18181 atafgtttat caccgcgaa gaagetatc gtcacgttcg tgcgtggatt ggctttgatg
18241 tagagggctg tcatgcaact agagatgctg tgggtactaa cctacctctc cagctaggat
18301 tttctacagg tgttaactta gtagctgtac egactggtta tgttgacact gaaaataaca
18361 cagaattcac cagagttaat gcaaaacctc caccagggtg ccagtttaa catcttatac
18421 cactcatgta taaaggcttg cctggaatg tagtgcgtat taagatagta caaatgctca
18481 gtgatacact gaaaggattg tcagacagag tctgttctgt cctttggcg cctggctttg
18541 agcttacatc aatgaagtac tttgtcaaga ttggacctga aagaactgtg tgtctgtgtg
18601 acaaactgct aactgcttt tctactcat cagatactta tgectgctgg aateattctg
18661 tgggttttga ctatgtgat aaccattta tgattgatgt tcagcagtg gctttacgg
18721 gtaaccttca gagtaccat gaccaactt gccaggta tggaaatgca catgtggcta
18781 gttgtgatgc tafcatgact agatgttag cagtccatga gtgctttgtt aagcgtttg
18841 attggtctgt tgaataacct attataggag atgaactgag ggttaattct gcttcagaa
18901 aagtacaaca catggttgtg aagtctgcat tgcttgcgta faagtttcca gttctcatg
18961 acattggaat tccaaaggct atcaagtgtg tgccctcaggc tgaagttaga tggagttct
19021 acgatgctca gccatgtagt gacaaagctt acaaaaataga ggaactcttc tttcttatg
19081 ctacacatca cgataaatct actgatggtg tttgtttgtt ttggaattgt aacgttgact
19141 gttaccagc caatgcaatt gtgtgtaggf ttgacacaag agtcttgtca aacttgaact
19201 taccaggctg tgatgggtgt agtttgtatg tgaataagca tgcattccac actccagctt
16261 tcgataaaag tgcatttact aatttaaagc aattgcccft ctttactat tctgatagtc
19321 cttgtgagtc tcatggcaaa caagtatggt cggatattga ttatgttcca ctcaaatctg
19381 ctactgtat tacacgatgc aatttaggtg gtgctgtttg cagacacct gcaaatgagt
19441 accgacgta cttggatgca tataatagta tgatttctgc tggatttagc ctatggattt
19501 acaacaatt tgaacttat aacctgtgga afacatttac caggttacag agtttagaaa
19561 atgtggctta taatgttgtt aataaaggac actttgatgg acacgccggc gaagcacctg

```

FIG. 3F

19621	tttccatcat	taataatgct	gtttacacaa	aggtagatgg	tattgatgtg	gagatccttg
19681	aaaataagac	aacacttcct	gttaatgttg	caittgagct	ttgggctaag	cgtaacatta
19741	aaccagtgcc	agagattaag	atactcaata	atitgggtgt	tgatatacgt	gctaatactg
19801	taatctggga	ctacaaaaga	gaagccccag	cacatgtatc	tacaataggt	gtctgcacaa
19861	tgactgacat	tgccaagaaa	cctactgaga	gtgcttgttc	ttcacttact	gtcttgtttg
19921	atggtagagt	ggaaggacag	gtagaccttt	ttagaaacgc	ccgtaaatggt	gttttaataa
19981	cagaaggttc	agtcaaaggt	ctaacacctt	caaagggacc	agcacaagct	agcgtcaatg
20041	gagtcacatt	aattggagaa	tcagtaaaaa	cacagtttaa	ctactttaag	aaagtagacg
20101	gcattattca	acagttgcct	gaaacctact	ttactcagag	cagagactta	gaggatttta
20161	agcccagatc	acaaatggaa	actgactttc	tcgagctcgc	tatggatgaa	ttcatacagc
20221	gatataagct	cgagggctat	gccttcgaac	acatcgttta	tgagatttc	agtcattggac
20281	aacttgggcg	tcttcattta	atgataggct	tagccaagcg	ctcacaagat	tcaccactta
20341	aattagagga	ttttatccct	atggacagca	cagtgaaaaa	ttacttcata	acagatgcgc
20401	aaacaggttc	atcaaaatgt	gtgtgttctg	tgattgatct	tttacttgat	gactttgtcg
20461	agataafaaa	gtcacaagat	ttgtcagtga	tttcaaaagt	ggtcaaggtt	acaattgact
20521	atgctgaaat	ttcattcatg	ctttgggtga	aggatggaca	tggtgaaacc	ttctacccaa
20581	aactacaagc	aagtcgagcg	tggaaccag	gtgttgcgat	gcctaacttg	tacaagatgc
20641	aaagaatgct	tcttgaaaag	tgtgaccttc	agaattatgg	tgaaaatcgt	gttaaccxaa
20701	aaggaataat	gatgaatgtc	gcaaaagtata	ctcaactgtg	tcaataactta	aatacactta
20761	ctttagctgt	acctacaac	atgagagtta	ttcactttgg	tgctggctct	gataaaggag
20821	ttgcaccagg	tacagctgtg	ctcagacaat	ggttgccaac	tggcacacta	cttgtcgatt
20881	cagatcttaa	tgacttcgtc	tcggacgcct	attctacttt	aattggagac	tgtgcaacag
20941	tacatacggc	taataaafgg	gaccttatta	ttagegatat	gtatgacct	aggaccaaac
21001	atgtgacaaa	agagaatgac	tctaagaag	ggtttttcac	ttatctgtgt	ggatttataa
21061	agcaaaaact	agccttgggt	ggttctatag	ctgtaaagat	aacagagcat	tcttggatg
21121	ctgaccttta	caagcttatg	ggccatttct	catgggtggac	agcttttgg	acaaatgtaa
21181	atgcatcacc	atcggaaagca	tttttaattg	gggctaacta	tcttggcaag	ccgaaggaa
21241	aaattgatgg	ctataccatg	catgctaact	acattttctg	gaggaacaca	aaacctatcc
21301	agttgtcttc	ctattcactc	tttgacatga	gcaaaatttc	tcttaaatga	agaggaactg
21361	ctgtaatgtc	tcttaaggag	aatcaaatca	atgatatgat	ttattctctt	ctggaaaaag
21421	gtaggcttat	cattagagaa	aacaacagag	ttgtggtttc	aagtgatatt	cttgttaaca
21481	actaaacgaa	catgtttatt	ttcttattat	ttctfactct	cactagtgg	agtgaccttg
21541	accggtgcac	cacttttgat	gatgtcaag	ctcctaatta	cactcaacat	acttcatcta
21601	tgaggggggt	ttactatcct	gatgaaattt	ttagatcaga	cactctttat	ttactcagg
21661	atttatttct	tccattttat	tctaagtta	cagggtttca	tactattaat	catacgtttg
21721	gcaaccctgt	catacctttt	aaggatggta	ttfaatttgc	tgccacagag	aaatcaaatg
21781	ttgtccgtgg	ttgggttttt	ggttctacca	tgaacaacaa	gtcacagtcg	gtgattatta
21841	ttaacaattc	tactaatgtt	gttatacag	catgtaactt	tgaattgtgt	gacaaccctt
21901	tctttgctgt	ttctaaacc	atgggtacac	agacacatac	tatgatattc	gataatgcat
21961	ttaattgcac	tttcgagtac	atactgtatg	ccttttcgct	tgatgtttca	gaaaagtcag
22021	gtaattttaa	acaactacga	gagtttgtgt	ttaaaaataa	agatgggttt	ctctaagttt
22081	ataagggcta	tcaacctata	gagtgatgtc	gtgatctacc	ttctgggttt	aacactttga
22141	aacctatltt	taagttgcct	cttggatatta	acattacaaa	ttttagagcc	attcttacag
22201	ccttttcacc	tgctcaagac	atttggggca	cgtcagctgc	agcctatltt	gttggctatt
22261	taaagccaac	tacatttatg	ctcaagtatg	atgaaaatgg	tacaatcaca	gatgctgttg
22321	attgttctca	aaatccactt	gctgaactca	aatgctctgt	taagagcttt	gagattgaca
22381	aaggaattta	ccagacctct	aatctcaggg	ttgttccctc	aggagatgtt	gtgagattcc
22441	ctaataattac	aaacttgtgt	ccttttggag	aggtttttaa	tgctactaaa	ttccctctctg
22501	tctatgcatg	ggagagaaaa	aaaatttcta	atttgtttgc	tgattactct	gtgctctaca
22561	actcaacatt	tttttcaacc	tttaagtgtc	atggcgtttc	tgccactaag	ttgaatgatc
22621	tttgcctctc	caatgtctat	gcagattcct	ttgtagtcaa	gggagatgat	gtaagacaaa
22681	tagcgcagg	acaaactgg	gttattgctg	attataatta	taaaattgcca	gatgatttca
22741	tgggttgtgt	ccttgccttg	aatactagga	acattgatgc	tacttcaact	ggtaattata
22801	attataaata	taggtatctt	agacatggca	agcttaggce	cctttgagaga	gacatataca
22861	atgtgccttt	ctccctgat	ggcaaacctt	gcaccccacc	tgctcttaat	tgttattggc
22921	cattaatga	ttatggtttt	tacaccacta	ctggcattgg	ctaccaacct	tacagagtgt

FIG. 3G

22981	tagtactttc	ttttgaactt	ttaaatgcac	cgccacgggt	ttgtggacca	aaattatcca
23041	ctgaccttat	taagaaccag	tgtgtcaatt	ttaattttaa	tggactcact	gggtactggtg
23101	tgttaactcc	ttcttcaaac	agattcaac	catttcaaca	atctggccgt	gatgtttctg
23161	atctcactga	ttccggtcga	gatcctaaaa	catctgaaat	attagacatt	tcaccttgcg
23221	cttttggggg	tgtaaagtga	attacacctg	gaacaaatgc	ttcatctgaa	gttgcgtgtc
23281	tatatcaaga	tgttaactgc	actgatgttt	ctacagcaat	tcattgcagat	caactcacac
23341	cagcttggcg	catatattct	actggaaaca	atgtattcca	gactcaagca	ggctgtetta
23401	taggagctga	gcattgtcgac	acttcttatg	agtgcgacat	tccatttga	gctggcattt
23461	gtgctagtta	ccatacagtt	tctttattac	gtagtactag	ccaaaaact	attgtggctt
23521	atactatgtc	tttaggtgct	gatagttcaa	ttgcttactc	taataacacc	attgctatag
23581	ctactaactt	ttcaattagc	attactacag	aagtaatgcc	tgtttctatg	gctaaaacct
23641	ccgtagattg	taatatgtac	atctgaggag	atctactga	atgtgctaat	ttgcttctcc
23701	aafatggtag	cttttgcaca	caactaaatc	gtgcactctc	aggtatttgc	gctgaacagg
23761	atcgcaaac	acgtgaagtg	ttcgctcaag	tcaaacaaat	gtacaaaacc	ccaactttga
23821	aatattttgg	tggttttaaf	ttttcacaaa	tattacctga	ccctctaaag	ccaactaaga
23881	ggtcttttaf	tgaggacttg	ctctttaata	aggtgacact	cgetgatgct	ggcttcatga
23941	agcaatatgg	cgaatgccta	ggtgatatta	atgctagaga	tctcatttgc	gctgagaagt
24001	tcaatggact	tacagtgttg	ccacctctgc	tcactgatga	tatgatgtct	gcctacactg
24061	ctgctctagt	tagtggtaact	gccactgctg	gatggacaat	tggtgctggc	gctgctcttc
24121	aaataccttt	tgtatgcaa	atggcatata	ggttcaatgg	catggaggtt	acccaaatg
24181	ttctctatga	gaacccaaaa	caaatcgcca	accaatttaa	caaggcgatt	agtcaaatc
24241	aagaatcact	tacaacaaca	tcaactgcat	tgggcaagct	gcaagacggt	gftaacccaga
24301	atgctcaagc	attaacacaa	cttgttaaac	aacttagctt	faatfttggg	gcaatttcaa
24361	gtgtgctaaa	tgatatcctt	tccgacttgc	ataaagtoga	ggcggaggta	caaattgaca
24421	ggttaattac	aggcagactt	caaagccttc	aaacctatgt	aacacaacaa	ctaactcagg
24481	ctgctgaaat	cagggtctct	gctaactctg	ctgctactaa	aatgtctgag	tggttctctg
24541	gacaatcaaa	aagagttgac	ttttgtgga	agggtacca	ccttatgtcc	ttcccacaag
24601	cagccccgca	tggtgtttgt	ttcctfacatg	tcacgtatgt	gcatcccag	gagaggaaact
24661	tcaccacagc	gccagcaatt	tgtcatgaa	gcaaagcata	cttccctcgt	gaagggttt
24721	ttgtgttaa	tggcacttct	tggtttatta	cacagaggaa	cttctttct	ccacaataa
24781	ttactacaga	caatacattt	gtctcaggaa	attgtgatgt	cgttatggc	atcattaaca
24841	acacagttta	tgatcctctg	caacctgagc	ttgactcaat	caaagaagag	ctggagaagt
24901	acttcaaaaa	tcatacatca	ccagatgttg	atcttggcga	catttcaggc	attaacgctt
24961	ctgtctgcaa	cattcaaaaa	gaaattgacc	gcctcaatga	ggtcgetaaa	aatttaaatg
25021	aatcactcat	tgaccttcaa	gaattgggaa	aatatgagca	atataataa	ttgctttggf
25081	atggttggct	cggttctatt	gctggactaa	ttgccatcgt	catggttaca	atcttgcctt
25141	gttgcactgac	tagttgttgc	agttgctca	agggtgcatg	ctcttgtggt	tcttgcgtca
25201	agtttgatga	ggatgactct	gagccagttc	tcaagggtgt	caattacat	tacacataaa
25261	cgaactatg	gatttgttta	tgagattttt	tactcttggg	tcaattactg	cacagccagt
25321	aaaaattgac	aatgcttctc	ctgcaagtac	tgttcatgct	acagcaacga	taccgctaca
25381	agcctcactc	ccttctggat	ggcttgttat	tggcgttgca	tttcttgcgt	ttttcagag
25441	cgtaccacaa	ataattgccc	tcaataaaag	atggcagcta	gccctttata	agggcttcca
25501	gttcatttgc	aatttactgc	tgctatttgt	taccatctat	tcacatcttt	tgttgcctgc
25561	tgcaggtafg	gagggcgaat	ttttgtacct	ctatgccttg	atataatttc	tacaatgcat
25621	caacgcattg	agaattatta	tgagatgttg	gctttgttgg	aagtgcaaat	ccaagaacc
25681	attactttat	gatgccactt	actttgtttg	ctggcacaca	cafaactatg	actactgtat
25741	accatataac	agtgtcacag	atacaattgt	cgttactgaa	ggtgacggca	tttcaacacc
25801	aaaactcaaa	gaagactacc	aaattggttg	ttattctgag	gataggcact	caggtgttaa
25861	agactatgtc	gttgacatg	gctatttca	cgaagttfac	taccagcttg	agtctacaca
25921	aattaactaca	gacactggtt	ttgaaaatgc	tacattcttc	atcttcaaca	agcttggtaa
25981	agaccaccg	aatgtgcaaa	tacacacaat	cgcgggctct	tcaggagttg	cfaatccagc
26041	aatggatcca	atttatgatg	agccgacgac	gactactagc	gtgcttctgt	aagcacaaga
26101	aagtgagtac	gaacttatgt	actcattcgt	ttcggaagaa	acaggtagct	taatagttaa
26161	tagcgtactt	cttttctctg	ctttcgtggt	attcttgcct	gtcacactag	ccatccttac
26221	tgcgcttcga	ttgtgtgctg	actgctgcaa	tattgtfaac	gtgagtttag	taaaaccaac
26281	ggtttacgct	tactcggctg	ttaaaaaatct	gaactcttct	gaaggagttc	ctgatcttct

FIG. 3H

```

26341 ggtctaaacg aactaactat tattattatt ctgtttggaa ctttaacatt gcttatcatg
26401 gcagacaacg gtaactattac cggtgaggag ctfaaacac tcctggaaca atggaacctg
26461 gtaataggtt tcctattcct agcctggatf atgttactac aattfgccta ttctaactcg
26521 aacaggtttt tgtacataat aaagctfgtt ttctcttggc tcttggtggc agtaaacactt
26581 gcttgfittg tgcttgctgc tgtctacaga abtaattggg tgactggcgg gattggcattt
26641 gcaatggctf gtattgtagg ctgatgtgg ctttagctact tcggtgcttc cttcaggctg
26701 tttgctcgtg cccgctcaaf gtggctatc aaccagaaa caaacattct tctcaatgtg
26761 cctctccggg ggacaattgt gccagaccg ctcatggaaa gtgaacttgt cattggtgct
26821 gtgatcattc gtggtcactf gccaatggcc ggacactccc tagggcctg tgacaitaag
26881 gacctgccaa aagagatcac tgtggctaca tcacgaacgc tttcttatta caaattagga
26941 gcgtccgagc gtgtaggcac tgaatcaggt ttgctgcct acaaccgcta ccgtattgga
27001 aactataaat taatatcaga ccacgccggt agcaacgaca atattgcttt gctagtacag
27061 taagtgacaa cagatgtttc atcttcttga cttccagggt acaatagcag agatattgat
27121 tatcattatg aggactttca ggattgctat ttggaaactt gacgttataa taagttcaat
27181 agtgagacaa ttatttaagc ctctaactaa gaagaattat tcggagttag atgatgaaga
27241 acctatggag ttagattatc ctgctgcaaa acatgaaaat tattctcttc ctgacattga
27301 ttgtatftac atcttgcgag ctatatcact atcaggagtg tgttagaggt acgactgtac
27361 tactaaaaga accttgccca tcaggaacat acgagggcaa ttcaccattt caccctctg
27421 ctgacaataa atttgcacta acttgcacta gcacacactt tgctttgct tgtgctgacg
27481 gtaactcgaca taccatcag ctgctgcaaa gatcagtttc accaaaactt tctatcagac
27541 aagaggaggt tcaacaagag ctctactcgc cacttttctt cattgttgcct gctctagfat
27601 ttttaatact ttgcttcacc attaagagaa agacagaatg aatgagctca ctttaaftga
27661 cttctatttg tgctttttag cctttctgct attccttgtf ttaataatge ttattataft
27721 ttggttttca cfcgaaatcc aggatctaga agaaccttgt accaaagctt aaacagacat
27781 gaaacttctc atgttttga cttgtatttc tctatgcagt tgcatafca ctgtagtaca
27841 gcgctgtgca tctaataaac ctcatgtgct tgaagatcct tgtaaggfac aacactaggg
27901 gtaataacta tagcaactgt tggcttgtg ctctaggaaa ggtttactt tttcatgaf
27961 ggcacactat ggttcaaaaca tgcacacctc atgttactat caactgtcaa gatccagctg
28021 gtgggtgcct fatagctagg tgttggtag ttcatgaagg tcaccaaaet gctgcaftta
28081 gagacgtact tqtqtgttfa aataaacgaa caaattaaaa tgcctgataa tggaccccaa
28141 tcaaaccaac gtagtccccc cggcattaca tttgggtggc ccacagatc aactgacaat
28201 aaccagaatg gaggacgcaa tggggcaagg ccaaaacagc gccgacccca aggtttacce
28261 aataaactg cgtcttgggt cacagctctc actcagcatg gcaaggagga acttagatc
28321 cctcgaggcc agggcgctcc aatcaacacc aatagtggtc cagatgacca aattggctac
28381 taccgaaagc ctaccgagc agttcgtggt ggtgacggca aatgaaaga aaatgacccc
28441 agatggtact tctattacct aggaactggc ccagaagctt cacttccctf cggcgctaac
28501 aaagaaggca tcgtatgggt tgcaactgag ggagccttga atacacccaa agaccacatt
28561 ggcaccgca atcctaataa caatgctgcc accgtgctac aacttctca aggaacaaca
28621 ttgccaaaag gcttctacgc agagggaagc agaggcggca gtaagctcc tictcgctcc
28681 tcatcacgta gtcgctgtaa ttcaagaaat tcaactcctg gcagcagtag gggaaattct
28741 cctgctcgaa tggctagcgg aggtggtgaa actgccctcg cgtatctgcf gctagagaga
28801 ttgaaccagc ttgagagcaa agtttctggt aaaggccaac aacaacaagg ccaactgtc
28861 acfaagaaat ctgctgctga ggcattaaa aagcctcgcc aaaaacgtaf tgcacaataa
28921 cagtacaacg tcaactcaagc atttgggaga cgtggctccag acaaaacca aggaaatttc
28981 gggaccaag acctaatcag acaaggaaact gattacaaac attggccgca aattgcacaa
29041 tttgctccaa gtgctctgce atctcttggc atgtcacgca ttggcatgga agtcaacctt
29101 tcgggaacat ggctgactfa tcatggagcc atfaaatfgg atgacaaaga tccacaatte
29161 aaagacaacg tcatactgct gaacaagcac attgacgat acaaaacatt cccaccaaca
29221 gagcctaaa aggacaaaaa gaaaaagact gatgaagctc agcctttgcc gcagagacca
29281 aagaagcagc ccactgtgac tcttcttctc gggctgaca tggatgatft ctcagacaa
29341 cttcaaaaat ccattgagtg agcttctgct gatccaactc aggcataac agctctgtag
29401 accacacaag gcagatgggc gcagatgggc gatccaactc tccgthtacy atacatagtc
29461 tactcttgtg cagaatgaat tctcgtaacf aaacagcaca agtaggttta gttacttta
29521 atctcacata gcaatcttta atcaatgtgt aacattaggg aggacttga agagccacca
29581 cattttcctc gagccacgc ggagtcgat cgaggttaca gfgaataatg ctagggagag
29641 ctgcctatat ggaagagccc faatgtgtaa aattaaattt agtagtcta tcccctgtg
29701 attttaatg cttcttagga gaatgacaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa a

```

FIG. 31

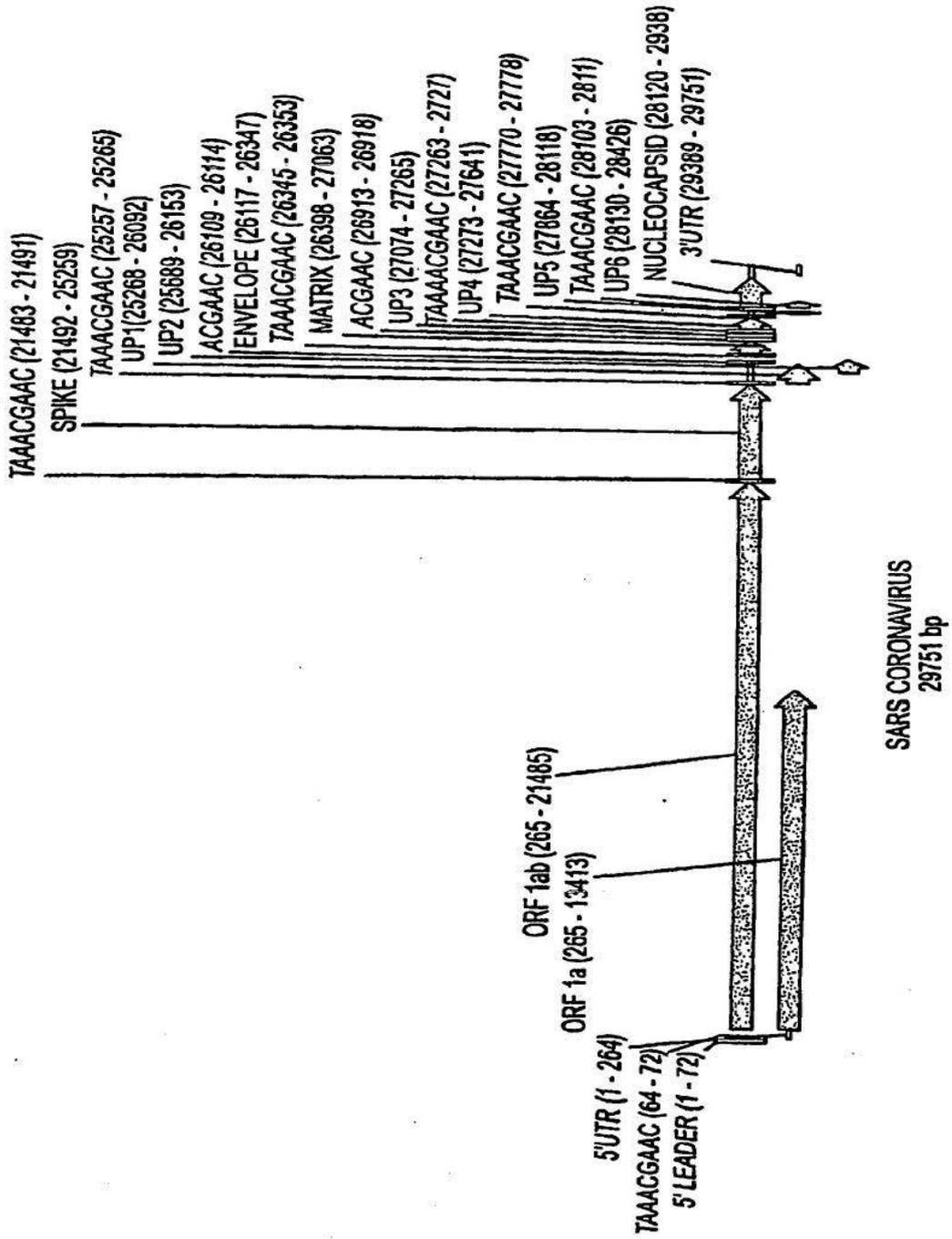
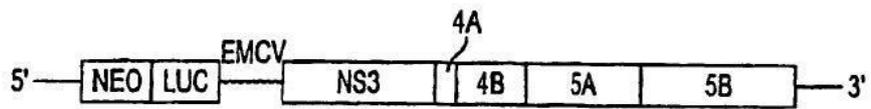


FIG. 4



NEO: GEN NEOMICINA FOSFOTRANSFERASA
LUC: LUCIFERASA DE LA MOSCA DE LA FRUTA
EMCV: SITO DE ENTRADA DE RIBOSOMA INTERNO TOMADO DE EMCV
NS3, NS4A, NS4B, NS4A, AND NS5B: PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DE VHC

FIG. 5

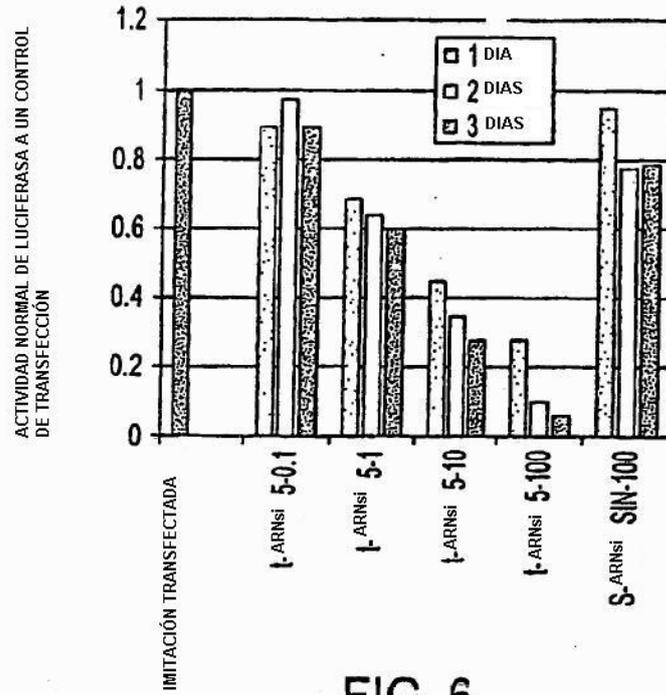


FIG. 6

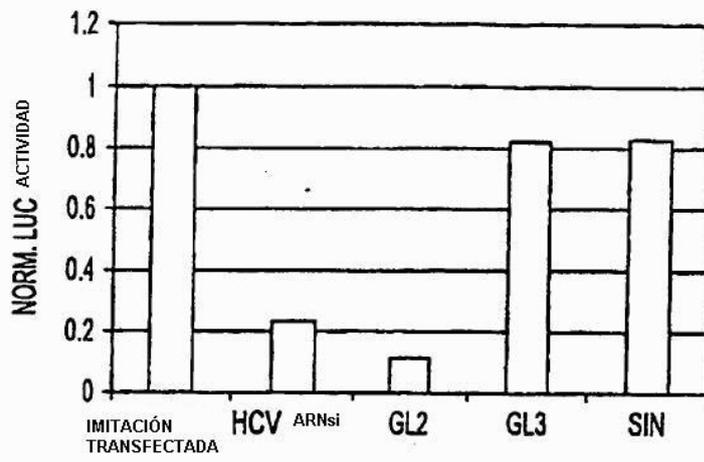


FIG. 7

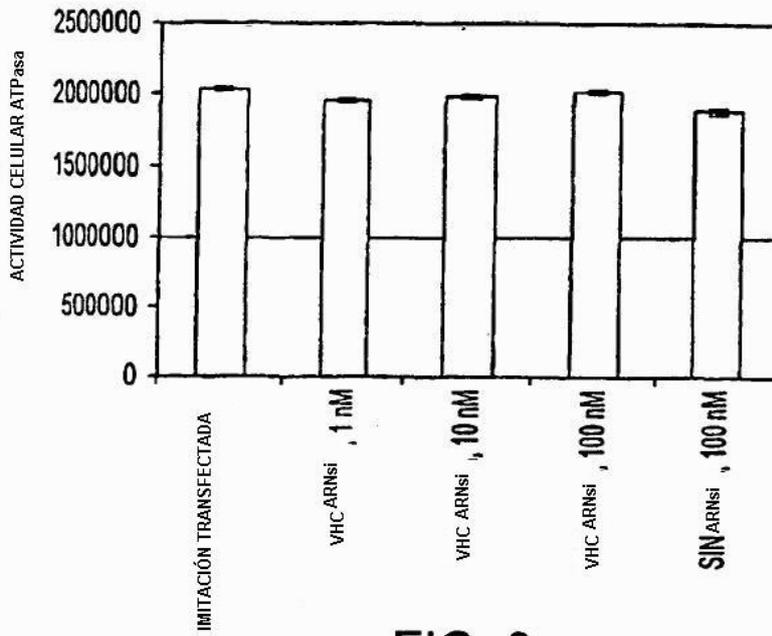


FIG. 8

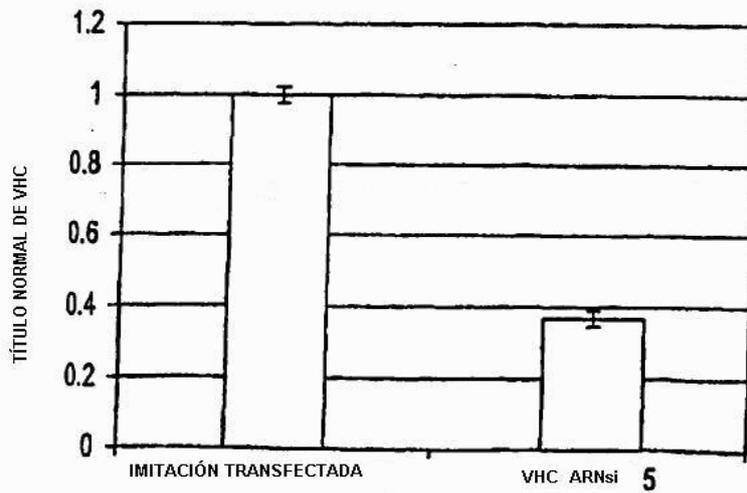


FIG. 9

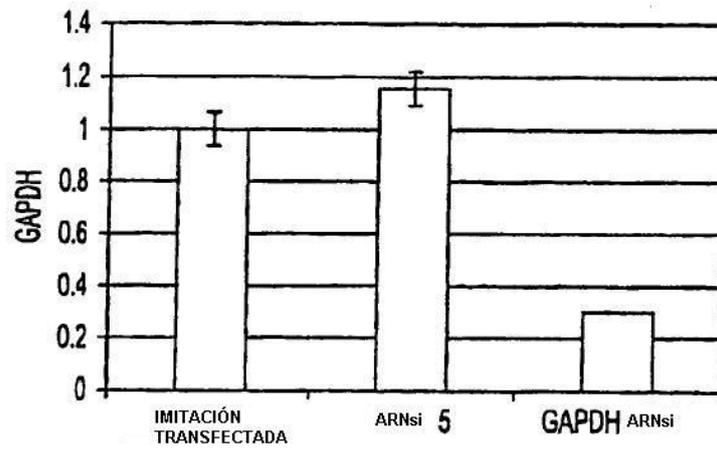


FIG. 10

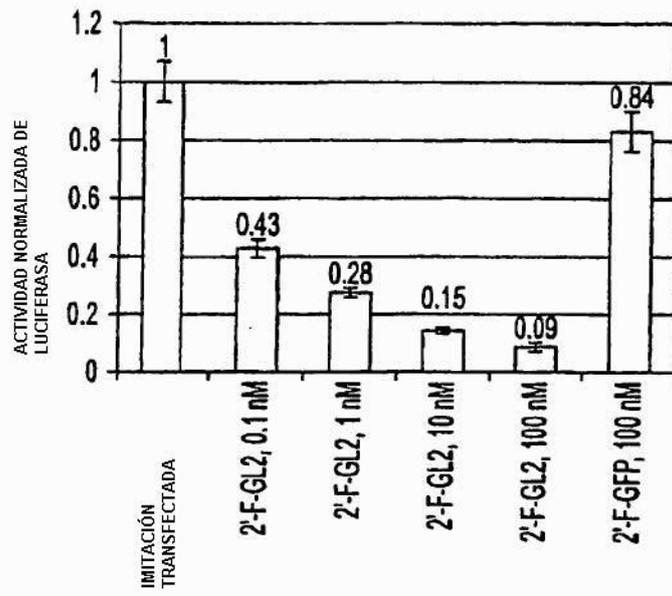


FIG. 11

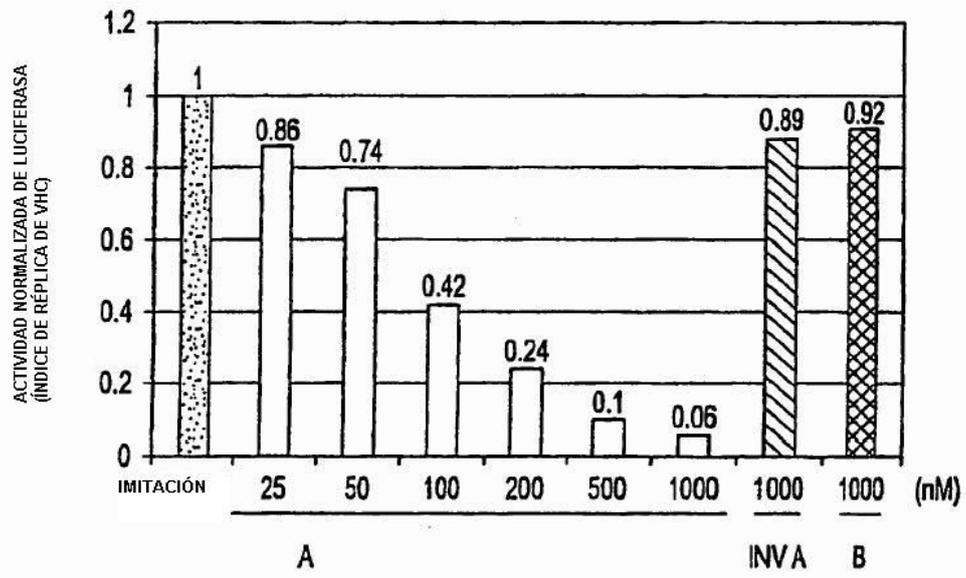


FIG. 12

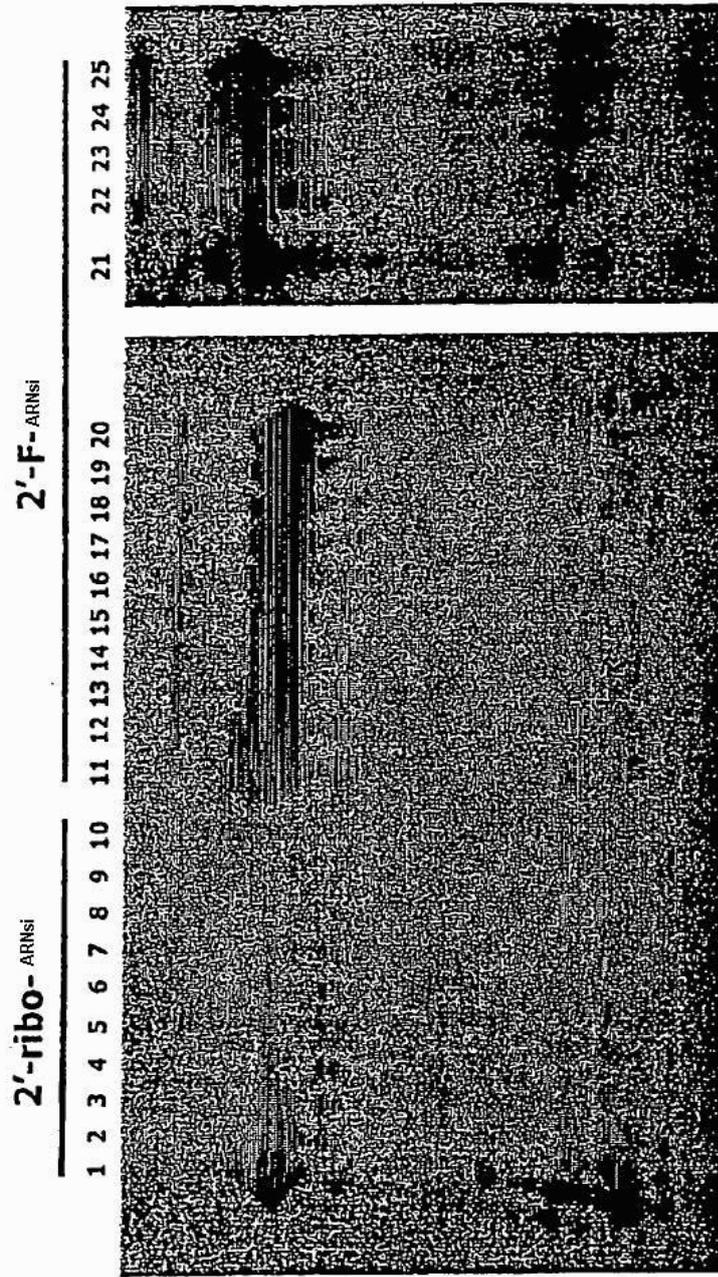


FIG. 13

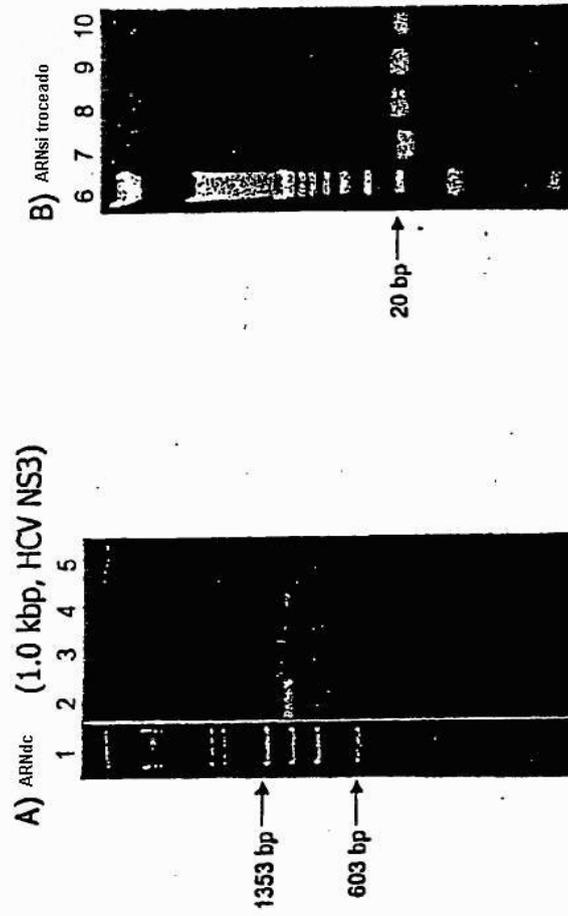


FIG. 14

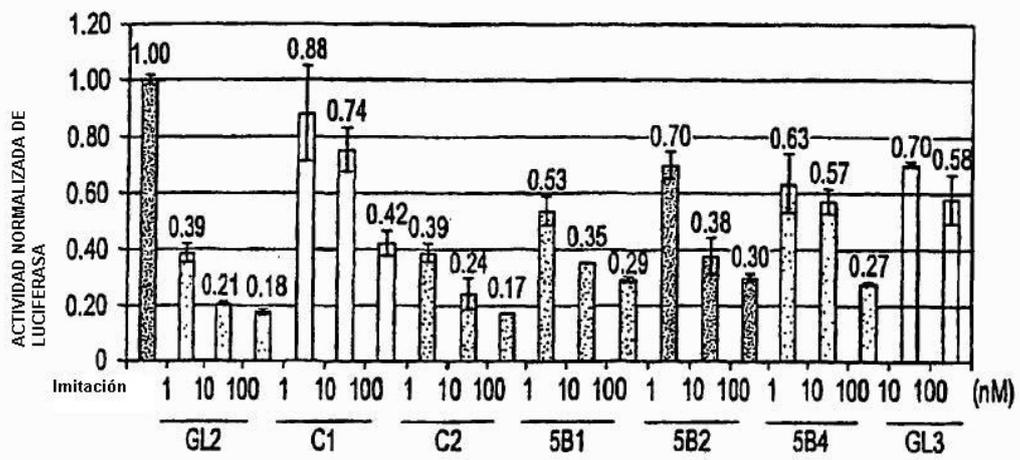


FIG. 15

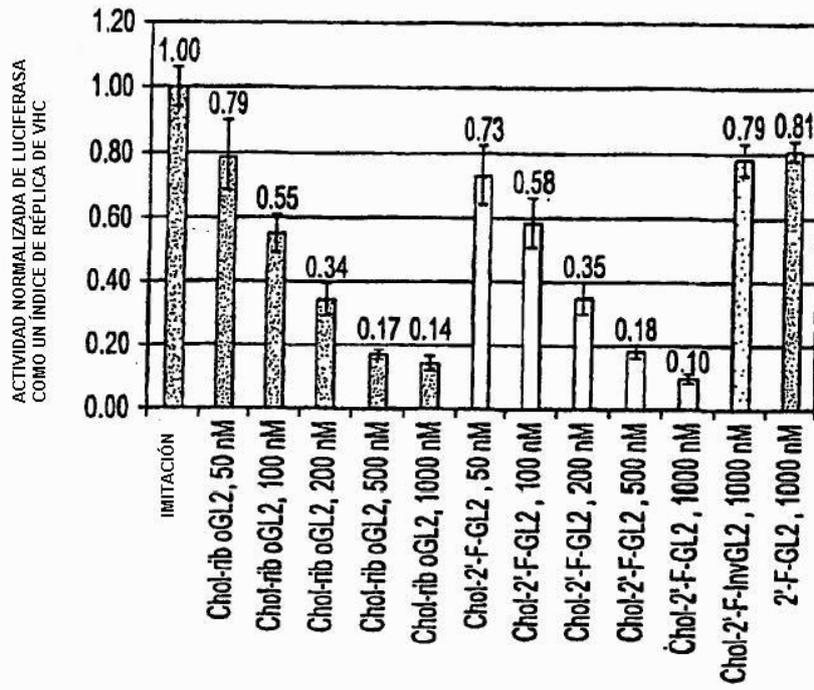
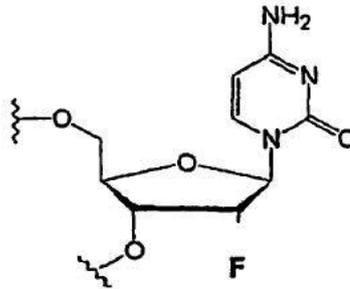


FIG. 16

2'-F-C/U



Propiedades conocidas de química 2'-F:

- Fluorización de ANS destruye actividad ARNasa-H.
 - Fluorización de Rbz en sitio catalítico destruye actividad enzimática.
 - Fluorización de ARNsi no afecta a la actividad de ARNsi
 - Algunos 2'-F-nucleósidos son tóxicos; pero 2'-F-C/U son no tóxicos: *Toxicol, Pathology (1999) 2/. 607-617*
- NO CONOCIDAS:
- Eficacia y seguridad in vivo

FIG. 17

Autoradiografía de duplicaciones de ARNsi etiquetados 5' incubados en suero humano y separados por 20% Gel Secuenciador



La fluorinación simple protege la ARNsi parcialmente. La protección extendida requiere modificación de 3'-ends, lo que sugiere que la 3'-exonucleasa es un mayor componente de nucleasas de serum.

FIG. 18

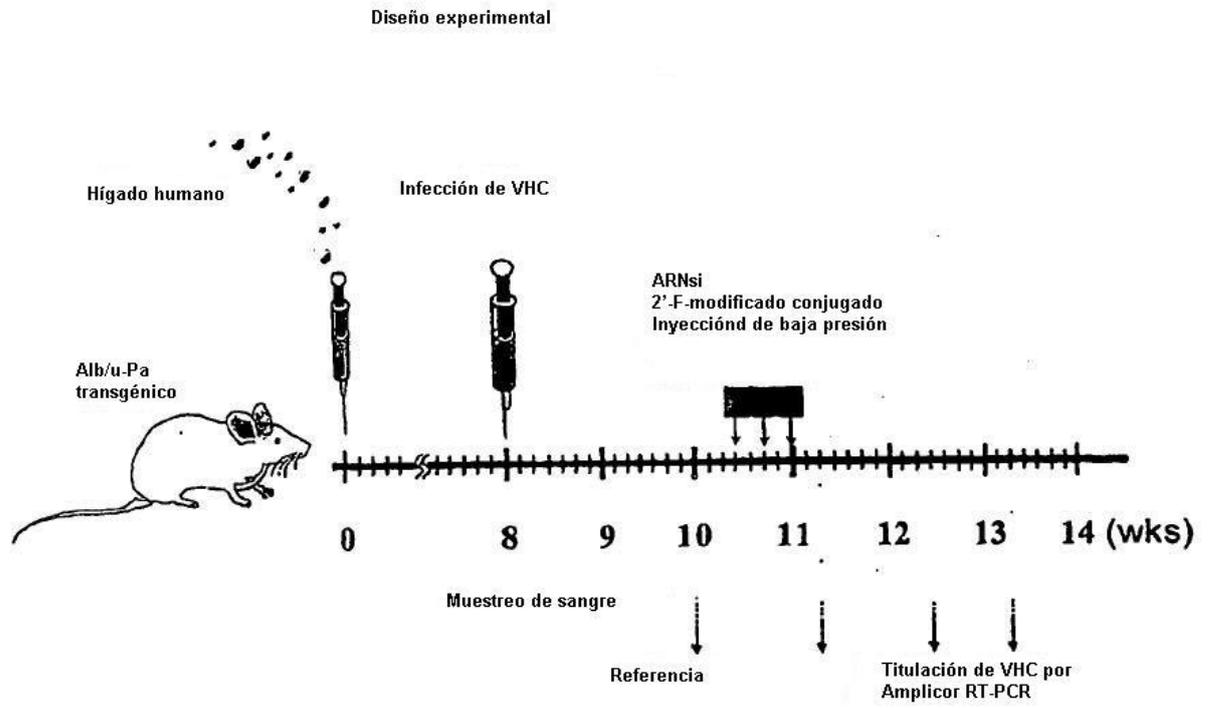
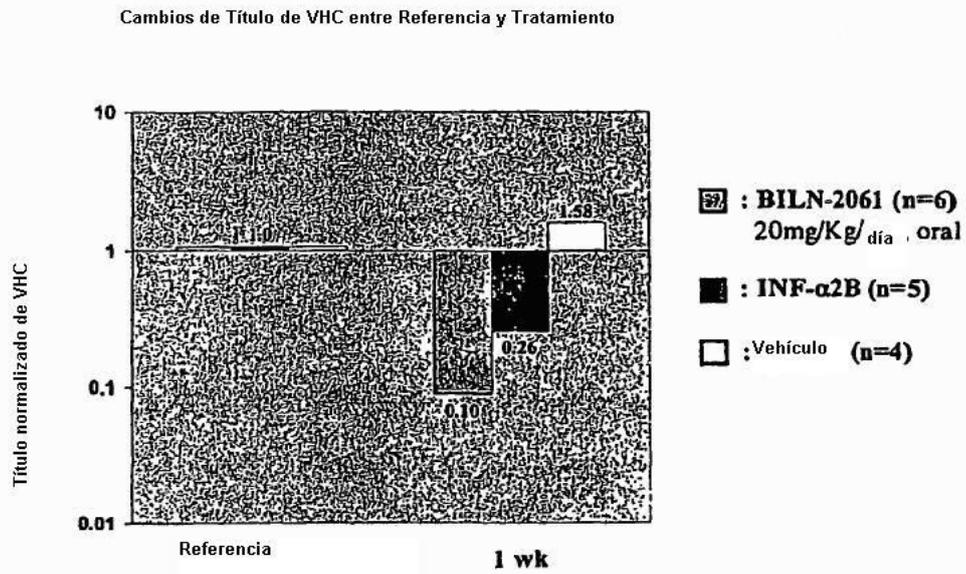


FIG. 19



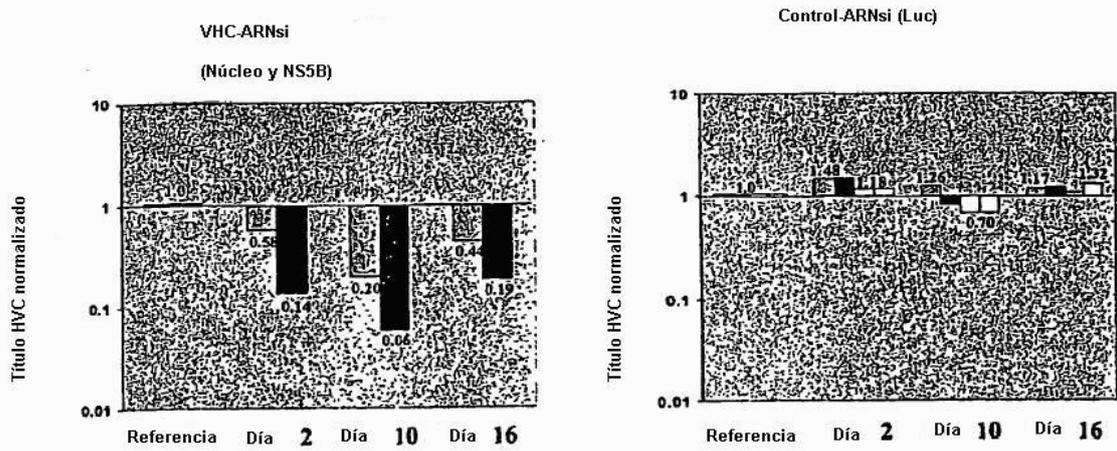
- Títulos de VHC determinados 1 semana después del tratamiento por Amplicor RT-PCR
- BILN-2061 es tan eficaz como IFN- α

Presentado en la 10ª Reunión Internacional de VHC y Virus Relacionados, Kioto, Japón Dic 2-6, 2003.

FIG. 20

Cambios de Título de VHC entre Referencia y Tratamiento

ARNsi: 6mg/kg, inyección en vena de cola/2d, 3X



Títulos de VHC determinados 2, 10, 16 días después de la inyección

FIG. 21