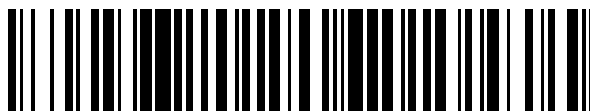


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 599**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2004** **E 12156572 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014** **EP 2468865**

54 Título: **Modulación de oligonucleótidos antisentido de la expresión STAT3**

30 Prioridad:

06.02.2004 US 773678

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

13.11.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

KARRAS, JAMES G.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 521 599 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación de oligonucleótidos antisentido de la expresión STAT3

Campo de la invención

5 Esta invención se relaciona con composiciones y métodos para modular la expresión del gen humano STAT3, el cual codifica una proteína enlazante de ADN presente de manera natural involucrada en la transducción de señales y activación transcripcional, y está implicada en enfermedades. Esta invención también se relaciona con métodos para inhibir la transducción de señales y activación transcripcional mediada por STAT3; estos métodos pueden ser utilizados como diagnóstico o terapéuticamente. Adicionalmente, esta invención se relaciona con el tratamiento de condiciones asociadas con la expresión del gen STAT3 humano.

10 Antecedentes de la invención

Las proteínas STAT (transductores de señal y activadores de transcripción) son proteínas enlazantes de ADN que juegan un papel doble en la transducción de señales y activación de la transcripción. Actualmente, hay seis miembros distintos de la familia STAT (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5, y STAT6) y varias isoformas (STAT1-alfa, STAT1-beta, STAT3-alfa y STAT3-beta). Las actividades de las STAT son moduladas por diversas citoquinas y estímulos mitogénicos.

15 El enlazamiento de una citoquina a su receptor da como resultado la activación de la proteína tirosina quinasa de Janus (JAK) asociadas con estos receptores. Esta a su vez, fosforila la STAT, dando como resultado la translocación al núcleo y la activación transcripcional de los genes que responden a STAT. La fosforilación en un residuo específico de tirosina de la STAT da como resultado su activación, dando como resultado la formación de homodímeros y/o heterodímeros de STAT los cuales se enlazan a secuencias promotoras de genes específicos. Los eventos mediados por las citoquinas a través de la activación de STAT incluyen proliferación celular y diferenciación y prevención de la apoptosis.

20 La especificidad de la activación de STAT es debida a citoquinas específicas, esto es, cada STAT es responsable de un número pequeño de citoquinas específicas. También se ha encontrado que otras moléculas de señalización que no son citoquinas, tales como los factores de crecimiento, activan las STAT. El enlazamiento de estos factores a un receptor de la superficie celular asociado con la proteína tirosina quinasa también da como resultado la fosforilación de STAT.

25 Se ha encontrado también que la STAT3 [también el factor de respuesta de fase aguda (APRF), STAT3-alfa], en particular, responde a la interleuquina-6 (IL-6) así como al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Darnell, Jr., J.E., et al., Science, 1994, 264, 1415-1421). Además, se ha encontrado que la STAT3 tiene un papel importante en la transducción de señales por interferones (Yang, C.-H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 5568-5572). Existe evidencia que sugiere que la STAT3 puede ser regulada por la ruta MAPK. La ERK2 induce la fosforilación de la serina y también se asocia con STAT3 (Jain, N., et al., Oncogene, 1998, 17, 3157-3167).

30 La STAT3 expresa en la mayor parte de los tipos celulares (Zhong, Z., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91, 4806-4810). Induce la expresión de genes involucrados en la respuesta a las lesiones e inflamación de tejidos. La STAT3 también ha demostrado prevenir la apoptosis a través de la expresión de bcl-2 (Fukada, T., et al., Immunity, 1996, 5, 449-460).

35 La expresión aberrante de o la expresión constitutiva de la STAT3 está asociada con un cierto número de procesos de enfermedades. La STAT3 ha demostrado estar involucrada en la transformación celular. Es activa constitutivamente en células transformadas por v-src (Yu, C.-L., et al., Science, 1995, 269, 81-83). La STAT3 activada constitutivamente también induce la expresión de genes mediada por STAT3 y se requiere para la transformación celular por medio de src (Turkson, J., et al., Mol. Cell. Biol., 1998, 18, 2545-2552). La STAT3 también es activa constitutivamente en células transformadas por el virus I linfotrófico de células T humano (HTLV-I) (Migone, T.-S. et al., Science, 1995, 269, 79-83).

40 La activación constitutiva y/o sobreexpresión de STAT3 parece estar involucrada en varias formas de cáncer incluyendo mieloma, carcinomas de seno, cáncer de próstata, tumores de cerebro, carcinomas de cabeza y cuello, melanoma, leucemias y linfomas, particularmente leucemia mielogenosa crónica y mieloma múltiple (Niu et al., Cancer Res., 1999, 59, 5059-5063). Las líneas celulares de cáncer de seno que sobreexpresan EGFR expresan constitutivamente STAT3 fosforilada (Sartor, C.I., et al., Cancer Res., 1997, 57, 978-987; Garcia, R., et al., Cell Growth and Differentiation, 1997, 8, 1267-1276). También se encontraron niveles de STAT3 activados elevados en glioblastomas y meduloblastomas de grado bajo (Cattaneo, E., et al., Anticancer Res., 1998, 18, 2381-2387).

45 Las células derivadas de cánceres de próstata tanto de ratas como humano han demostrado tener STAT3 activada constitutivamente, estando relacionada la activación de STAT3 con potencial maligno. La expresión de STAT3 negativo dominante se encontró que inhibía significativamente el crecimiento de células de próstata humana (Ni et al., Cancer Res., 2000, 60, 1225-1228).

También se ha encontrado que la STAT3 es activada constitutivamente en algunas leucemias agudas (Gouilleux-Gruart, V., et al., *Leuk. Lymphoma*, 1997, 28, 83-88) y en linfomas de células T (Yu, C.-L., et al., *J. Immunol.*, 1997, 159, 5206-5210). De manera interesante, se ha encontrado que la STAT3 es fosforilada constitutivamente en un residuo de serina en leucemia linfocítica crónica (Frank, D. A., et al., *J. Clin. Invest.*, 1997, 100, 3140-3148).
 5 Además, se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido a la STAT3 promueven la apoptosis en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Song et al., *Oncogene* 22:4150, 2003) y en células de cáncer de próstata (Mora et al., *Cancer Res.* 62:6659, 2002).

Se ha encontrado que la STAT3 es constitutivamente activa en células de tumores de mieloma, tanto en cultivo como en células mononucleares de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple. Estas células son resistentes a la apoptosis mediada por Fas y expresan altos niveles de BcL-xL. La señalización de STAT3 demostró ser esencial para la supervivencia de células tumorales de mieloma confiriendo resistencia a la apoptosis (Catlett-Falcone, R., et al., *Immunity*, 1999, 10, 105-115). La STAT3 activada constitutivamente también está asociada con leucemia mielogenosa crónica. Así la STAT3 es un objetivo potencial para la intervención terapéutica en múltiples cánceres de mieloma y otros con rutas de señalización de STAT3 activadas. Las opciones para el tratamiento de pacientes con mieloma múltiple no son completamente satisfactorias. El Velcade fue aprobado en mayo del 2003 con un ensayo de pivote de 188 pacientes evaluables con base en encogimiento de tumor, no en supervivencia. Solamente el 28% (de los pacientes mostró una respuesta parcial. Los datos están actualmente bajo revisión de la FDA. Hay una necesidad médica distintiva por terapias novedosas para el mieloma quimiorresistente.

Se ha utilizado una metodología de terapia genética en un sistema de modelo de tumor de ratón singenético para inhibir la STAT3 activada *in vivo* utilizando una variante de STAT3 negativa dominante. Se encontró que esta señalización de STAT3 activada suprime el crecimiento del tumor de melanoma B16 e induce la apoptosis de células tumorales B16 *in vivo*. De manera interesante, el número de células apoptóticas (95%) excedió el número de células transfectadas, indicando un posible "efecto supresor" antitumoral en el cual una respuesta inflamatoria (infiltración del tumor por células inflamatorias agudas y crónicas) puede participar en la matanza de células tumorales residuales (Niu et al., *Cancer Res.*, 1999, 59, 5059-5063).

La STAT3 también puede jugar un papel en enfermedades inflamatorias incluyendo la artritis reumatoide. La STAT3 activada ha sido encontrada en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Sengupta, T.K., et al., *J. Exp. Med.*, 1995, 181, 1015-1025) y en células de articulaciones inflamadas (Wang, F., et al., *J. Exp. Med.*, 1995, 182, 1825-1831).

La división alternativa da como resultado la formación de STAT3, la cual está caracterizada por la ausencia de 55 residuos de aminoácidos encontrados en el termino C de STAT3. Este dominio contiene el dominio de transactivación, y así, la STAT3 puede actuar como regulador negativo de la función de STAT3.

Se ha encontrado que la STAT3 es más estable y tiene mayor actividad de enlazamiento a ADN que la STAT3, mientras que la STAT3 es más activa transcripcionalmente. La STAT3, también como la STAT3, forma homodímeros, y los dos también pueden enlazarse entre sí como un heterodímero (Caldenhoven, E., et al., *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 13221-13227).

Hay actualmente varias metodologías para inhibir la expresión de STAT3. Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,719,042 y 5,844,082, ambas concedidas conjuntamente a Akira, S. y Kishimoto, T. enseñan el uso de inhibidores de APRF, incluyendo anticuerpos, ácidos nucleicos antisentido y ribozimas para el tratamiento de enfermedades asociadas con IL-6, tales como enfermedades inflamatorias, leucemia y cáncer. Schreiber, R.D., et al., en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5, 731,155; 5, 582,999; y 5, 463,023, divulgan métodos para inhibir la activación transcripcional utilizando péptidos cortos que se enlazan a p91. Darnell, J.E., et al., en la Patente de los Estados Unidos No. 5, 716,622, divulga péptidos que contienen el dominio enlazante de ADN de STAT, proteínas quiméricas que contienen el dominio de enlazamiento a ADN, y anticuerpos para STAT para inhibir la activación transcripcional de STAT

Ha sido divulgado el uso de un oligonucleótido antisentido direccionado a la región de inicio de la traducción de STAT3 humana (Grandis, J. R., et al., *J. Clin. Invest.*, 1998, 102, 1385-1392). En este reporte, un oligodesoxinucleótido fosforotioato complementario a la región de inicio de la traducción de STAT3 inhibió el crecimiento de células estimuladas THF- β mediado por el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), sugiriendo que la STAT3 es un componente de la ruta de señalización de EGFR.

La WO 00/61102 divulga composiciones, compuestos y métodos para inhibir la expresión de STAT3. Las composiciones comprenden oligonucleótidos antisentido direccionados a ácidos nucleicos que codifican STAT3.

Se mantienen una necesidad no satisfecha por composiciones y métodos terapéuticos que apunten a la expresión de STAT3, y procesos de enfermedad asociados con la misma.

Resumen de la invención

La invención provee un oligonucleótido antisentido de 12 a 50 nucleobases en longitud, el cual específicamente hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica STAT3 y es capaz de inhibir la expresión de STAT3, y en donde el oligonucleótido está direccionado a los nucleótidos 2983 a 3127 de SEQ ID NO:154.

5 La invención también provee una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también provee un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención para uso en terapia o profilaxis.

Resumen de la divulgación

10 La presente divulgación provee oligonucleótidos los cuales apuntan a ácidos nucleicos que codifican STAT3 y son capaces de modular la expresión de STAT3. La presente divulgación también provee oligonucleótidos quiméricos direccionados a ácidos nucleicos que codifican STAT3 humano.

La presente divulgación también comprende métodos para modular la expresión de STAT3 humano, en células y tejidos, utilizando los oligonucleótidos de la divulgación.

15 La presente divulgación comprende adicionalmente métodos para diagnosticar y tratar enfermedades inflamatorias, particularmente artritis reumatoide, y cánceres, incluyendo los de seno, próstata, cabeza y cuello y cerebro, mielomas, melanomas, leucemias y linfomas. Se cree que los oligonucleótidos y métodos de la presente divulgación son útiles terapéutica y profilácticamente. Se cree adicionalmente que los oligonucleótidos de la presente divulgación son útiles como herramientas de investigación clínica y diagnóstico, así como para la detección y determinación del papel de STAT3 en diversas funciones celulares y procesos y condiciones fisiológicas y para condiciones de diagnóstico asociadas con la expresión de STAT3.

Descripción detallada

25 La STAT3 juega un papel importante en la transducción de la señal de citoquina. La sobreexpresión y/o activación constitutiva de STAT3 está asociada con un cierto número de enfermedades inflamatorias y cánceres. Como tal, esta proteína de enlace a ADN representa un objetivo atractivo para el tratamiento de tales enfermedades, en particular, la modulación de la expresión de STAT3 puede ser útil para el tratamiento de enfermedades tales como artritis reumatoide, cáncer de seno, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, mielomas, melanomas, leucemias y linfomas.

30 La presente invención emplea compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, para uso en la modulación de la función de moléculas de ácidos nucleicos que codifican STAT3, modulando finalmente la cantidad de STAT3 producida. Esto se logra proveyendo oligonucleótidos que hibridan específicamente con ácidos nucleicos, preferiblemente ARNm, que codifica STAT3.

35 Esta relación entre un compuesto antisentido tal como un oligonucleótido y su objetivo de ácido nucleico complementario reverso al cual hibrida, se denomina comúnmente como "antisentido". "Direccionamiento" de un oligonucleótido a un ácido nucleico objetivo escogido, en el contexto de esta invención, es un proceso de etapas múltiples. El proceso comienza usualmente con la identificación de una secuencia de ácidos nucleicos cuya función va a ser modulada. Este puede ser, como ejemplo, un gen celular (o ARNm hecho a partir del gen) cuya expresión está asociada con un estado de enfermedad particular, o un ácido nucleico foráneo de un agente infeccioso.

40 En la presente invención, los objetivos son ácidos nucleicos que codifican STAT3; en otras palabras, un gen que codifica STAT3 o ARNm expresado a partir del gen STAT3, ARNm que codifica STAT3 es actualmente el objetivo preferido. El proceso de direccionamiento también incluye la determinación de un sitio o sitios dentro de la secuencia de ácidos nucleicos para que la interacción antisentido ocurra de tal manera que resulte una modulación de la expresión del gen.

45 De acuerdo con esta invención, las personas de experiencia normal en la técnica entenderán que el ARN mensajero incluye no solamente la información para codificar una proteína utilizando el código genético de tres letras, si no también los ribonucleótidos asociados que forman una región conocida por tales personas como la región no traducida 5', la región no traducida 3', la región cubierta 5' y los ribonucleótidos de unión intrón/exón. Así, pueden formularse de acuerdo con esta invención oligonucleótidos que están direccionados completamente o en parte a aquellos ribonucleótidos asociados así como a los ribonucleótidos de información. El oligonucleótido puede por lo tanto ser hibridable específicamente con una región de sitio de iniciación de transcripción, una región de codón de iniciación de traducción, una región de cubiertas 5', una unión intrón/exón, secuencias de codificación, una región de codeterminación de la traducción o secuencias en la región no traducida 5' o 3'. Puesto que, como es conocida en la técnica, el codón de iniciación de la traducción es típicamente 5'-AUG (moléculas de ARNm transcritas; 5' ATG en la molécula de ADN correspondiente), el codón de iniciación de la traducción también es denominado como "codón AUG", el "codón de iniciación" o el "región de inicio AUG". Una minoría de genes tiene un codón de iniciación de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG han demostrado

funcionar *in vivo*. Así, los términos “codón de iniciación de la traducción” y “codón de inicio” pueden abarcar muchas secuencias de codones, aunque el aminoácido iniciador en cada caso es típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (procariotas). También es sabido en la técnica que los genes eucarióticos y procarióticos pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede ser utilizado preferencialmente para la iniciación de la traducción en un tipo celular o de tejido particular, o bajo un conjunto particular de condiciones. En el contexto de la invención, “codón de inicio” y “codón de iniciación de la traducción” se refieren al codón o codones que se utilizan *in vivo* para iniciar la traducción de una molécula de ARNm transcrita a partir de un gen que codifica STAT3, independientemente de las secuencias de tales codones. También es sabido en la técnica que un codón de terminación de la traducción (o “codón de detención”) de un gen puede tener una de tres secuencias, esto es 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (las secuencias de ADN correspondientes son 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente). Los términos “región de codón de inicio”, “región AUG” y “región de codón de iniciación de la traducción” se refieren a una porción de un ARNm o gen que abarca desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (esto es, 5' o 3') a partir de un codón de iniciación de la traducción. Esta región es una región objetivo preferida. De la misma manera, los términos “región de codón de detención” y “región de codón de terminación de la traducción” se refieren a una porción de tal ARNm o gen que abarca desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (esto es, 5' o 3') a partir de un codón de terminación de la traducción. Esta región es una región objetivo preferida. El marco de lectura abierto (ORF) o “región de codificación”, que es conocida en la técnica por referirse a la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción, es también una región a la cual se puede apuntar de manera efectiva. Otras regiones objetivo preferidas incluyen la región no traducida 5' (5' UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción de ARNm en la dirección 5' a partir del codón de iniciación de la traducción, y que incluye así nucleótidos entre el sitio de cubierta 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen y a la región no traducida 3' (3' UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción de ARNm en la dirección 3' a partir del codón de terminación de la traducción, e incluyendo así nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen. La cubierta 5' del ARNm comprende un residuo de guanosina metilado en N7 unido al residuo más 5' del ARNm a través de un enlace trifosfato 5' - 5'. Se considera que la región de cubierta 5' de un ARNm incluye la estructura de cubierta 5' en sí misma así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la cubierta. La región de cubierta 5' también puede ser una región objetivo preferida.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucarióticos son traducidos directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como “intrones”, los cuales son escindidas de un transcripto de preARNm para producir uno o más ARNm maduros. Las regiones restantes (y por lo tanto traducidas) son conocidas como “exones” y están divididas juntas para formar una secuencia de ARNm continua. Los sitios de división de ARNm, esto es, uniones exón-exón o intrón-exón, también pueden ser regiones objetivo preferidas, y son particularmente útiles en situaciones en donde la enfermedad está implicada en una división aberrante, o donde una sobreproducción de un producto de división de ARNm en particular está implicada en la enfermedad. Las uniones de fusión aberrantes debido a reordenamientos o eliminaciones también son objetivos preferidos. También pueden ser preferidos los exones particulares a los cuales apunta el ARNm divididos alternativamente. También se ha encontrado que los intrones también pueden ser regiones objetivo efectivas y por lo tanto preferidas para compuestos antisentido direccionados, por ejemplo, a ADN o pre ARNm.

Una vez que el sitio o sitios objetivos han sido identificados, se escogen los oligonucleótidos que sean suficientemente complementarios al objetivo, esto es, que hibriden suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar la modulación deseada.

“Hibridación”, en el contexto de esta invención, significa el enlazamiento de hidrógeno, también conocido como apareamiento de bases de Watson-Crick, entre bases complementarias, usualmente en cadenas de ácidos nucleicos opuestas o dos regiones de una cadena de ácido nucleico. La guanina y la citosina son ejemplos de bases complementarias de las que se saben que forman estos puentes de hidrógeno entre ellos. La adenina y timina son ejemplos de bases complementarias que forman dos enlaces de hidrógeno entre ellas.

“Específicamente hibridables” y “complementarios” son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad tal que se presenta un enlazamiento estable y específico entre objetivos ADN o ARN y el oligonucleótido.

Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser 100% complementario a su secuencia de ácido nucleico objetivo para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando el enlazamiento del oligonucleótido al objetivo interfiere con el papel normal de la molécula objetivo para producir una pérdida de función o actividad, y hay suficiente grado de complementariedad para evitar un enlazamiento no específico del oligonucleótido a secuencias no objetivo bajo condiciones en las cuales se desea un enlazamiento específico, esto es, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamientos terapéuticos o, en el caso de ensayos *in vitro*, bajo las condiciones en las cuales se llevan a cabo los ensayos.

La hibridación de oligonucleótidos antisentido con ARNm interfiere con una o más de las funciones normales del ARNm. Las funciones del ARNm que va a ser interferido incluyen cualquier función vital tal como, por ejemplo, la

translocación del ARN al sitio de la traducción de proteínas, traducción de la proteína desde el ARN, división del ARN para producir una o más especies de ARNm, y actividad catalítica la cual puede ser acoplada por el ARN. El enlazamiento de proteínas específicas al ARN también puede ser interferido por la hibridación de un oligonucleótido antisentido al ARN.

5 Las localizaciones sobre el ácido nucleico objetivo a las cuales los compuestos antisentido preferidos hibridan son denominadas de aquí en adelante como "segmentos objetivo". Tal como se utiliza aquí el término "segmento objetivo" se define como al menos una porción de 8 nucleobases de una región objetivo a la cual se direcciona un compuesto antisentido activo. A la vez que no se desea estar limitados por la teoría, se cree actualmente que estos segmentos objetivos presentan porciones del ácido nucleico objetivo que son accesibles para la hibridación.

10 Mientras que las secuencias específicas de ciertos segmentos objetivos se definen aquí, una persona experimentada en la técnica reconocerá que estos sirven para ilustrar y describir realizaciones particulares dentro del alcance de la presente invención. Pueden identificarse segmentos objetivo adicionales por una persona de experiencia normal.

15 Los segmentos objetivos de 8 – 80 nucleobases de longitud que comprenden un estiramiento de al menos ocho (8) nucleobases consecutivas seleccionadas dentro de los segmentos objetivos preferidos ilustrativos se consideran como adecuados también como objetivos.

20 Los segmentos objetivos pueden incluir secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos 8 nucleobases consecutivas a partir del término 5' de uno de los segmentos objetivo ilustrativos (siendo las nucleobases restantes un estiramiento consecutivo del mismo ADN o ARN que comience inmediatamente corriente arriba del término 5' del segmento objetivo y continua hasta el ADN o ARN que contiene desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleobases). De la misma forma los segmentos objetivos son representados por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos las 8 nucleobases consecutivas a partir del término 3' de uno de los segmentos objetivo preferidos ilustrativos (siendo las nucleobases restantes un estiramiento consecutivo del mismo ADN o ARN que comience inmediatamente corriente abajo del término 3' del segmento objetivo y que continua hasta que el ADN o

25 ARN contiene desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleobases). También se entiende que los segmentos objetivo antisentido pueden ser representados por secuencias de ADN o ARN que comprenden al menos 8 nucleobases consecutivas a partir de una porción interna de la secuencia de un segmento objetivo preferido ilustrativo, y puede extenderse en cualquiera o en ambas direcciones hasta que el oligonucleótido contenga aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleobases. Una persona con experiencia en la técnica armada con los segmentos objetivos ilustrados aquí será capaz, sin experimentación indebida, de identificar segmentos

30 objetivo preferidos adicionales.

Una vez que uno o más regiones, segmentos o sitios objetivo hayan sido identificados, se escogen los compuestos antisentido que sean suficientemente complementarios al objetivo, esto es, que hibriden suficientemente bien y con suficiente especificidad, para dar el efecto deseado.

35 Los compuestos antisentido oligoméricos también pueden ser direccionados a regiones de una secuencia de nucleobases objetivo, tal como la divulgada aquí. Todas las regiones de una secuencia de nucleobases a la cual puede ser dirigido un compuesto antisentido u oligomérico, en donde las regiones son mayores que o iguales a 8 y menores que o iguales a 80 nucleobases, se describen como sigue:

40 Sea $R(n, n+m-1)$ una región de una secuencia de nucleobases objetivo, donde "n" es la posición de nucleobase más hacia 5' de la región, en donde, "n+m-1" es la posición de nucleobases más hacia 3' de la región y en donde "m" es la longitud de la región. Un conjunto "S (m)", de regiones de longitud "m" se define como la región en donde n varía de 1 a L-m+1, en donde L es la longitud de la secuencia de nucleobases objetivo y L>m. Un conjunto "A", de todas las regiones puede ser construido como la unión de los conjuntos de regiones para cada longitud desde la cual m es mayor o igual a 8 y es menor que o igual a 80.

45 Este conjunto de regiones puede ser representado utilizando la siguiente notación matemática:

$$A = \bigcup_m S(m) \quad \text{donde } m \in \mathbb{N} | 8 \leq m \leq 80$$

y

$$S(m) = \{R_{n, n+m-1} | n \in \{1, 2, 3, \dots, L - m + 1\}\}$$

en donde el operador matemático | indica "tal que",

en donde el operador matemático $\in$ indica "un miembro de un conjunto" (por ejemplo, $y \in Z$ indica que el elemento y es un miembro del conjunto Z),

donde x es una variable.

donde N indica todos los números naturales, definidos como enteros positivos,

5 y en donde el operador matemático $\cup$ indica "la unión de conjuntos".

Por ejemplo, el conjunto de regiones para m igual a 8, 20 y 80 puede ser construido de la siguiente manera. El conjunto de regiones, cada 8 nucleobases de longitud, $S(m=8)$, en una secuencia de nucleobases objetivo de 100 nucleobases de longitud ($L=100$), que comienza en una posición 1 ($n=1$) de la secuencia de nucleobases objetivo, puede crearse utilizando la siguiente expresión:

10

$$S(8) = \{R_{1,8} | n \in \{1,2,3,...,93\}\}$$

y describe el conjunto de regiones que comprende las nucleobases 1-8, 2-9, 3-10, 4-11, 5-12, 6-13, 7-14, 8-15, 9-16, 10-17, 11-18, 12-19, 13-20, 14-21, 15-22, 16-23, 17-24, 18-25, 19-26, 20-27, 21-28, 22-29, 23-30, 24-31, 25-32, 26-33, 27-34, 28-35, 29-36, 30-37, 31-38, 32-39, 33-40, 34-41, 35-42, 36-43, 37-44, 38-45, 39-46, 40-47, 41-48, 42-49, 43-50, 44-51, 45-52, 46-53, 47-54, 48-55, 49-56, 50-57, 51-58, 52-59, 53-60, 54-61, 55-62, 56-63, 57-64, 58-65, 59-66, 60-67, 61-68, 62-69, 63-70, 64-71, 65-72, 66-73, 67-74, 68-75, 69-76, 70-77, 71-78, 72-79, 73-80, 74-81, 75-82, 76-83, 77-84, 78-85, 79-86, 80-87, 81-88, 82-89, 83-90, 84-91, 85-92, 86-93, 87-94, 88-95, 89-96, 90-97, 91-98, 92-99, 93-100.

15

Un conjunto adicional para regiones de 20 nucleobases de longitud, en una secuencia objetivo de 100 nucleobases de longitud, que comienza en la posición 1 de la secuencia de nucleobases objetivo, puede ser descrito usando la siguiente expresión:

20

$$S(20) = \{R_{1,20} | n \in \{1,2,3,...,81\}\}$$

y describe el conjunto de regiones que comprende las nucleobases 1-20, 2-21, 3-22, 4-23, 5-24, 6-25, 7-26, 8-27, 9-28, 10-29, 11-30, 12-31, 13-32, 14-33, 15-34, 16-35, 17-36, 18-37, 19-38, 20-39, 21-40, 22-41, 23-42, 24-43, 25-44, 26-45, 27-46, 28-47, 29-48, 30-49, 31-50, 32-51, 33-52, 34-53, 35-54, 36-55, 37-56, 38-57, 39-58, 40-59, 41-60, 42-61, 43-62, 44-63, 45-64, 46-65, 47-66, 48-67, 49-68, 50-69, 51-70, 52-71, 53-72, 54-73, 55-74, 56-75, 57-76, 58-77, 59-78, 60-79, 61-80, 62-81, 63-82, 64-83, 65-84, 66-85, 67-86, 68-87, 69-88, 70-89, 71-90, 72-91, 73-92, 74-93, 75-94, 76-95, 77-96, 78-97, 79-98, 80-99, 81-100.

25

Un conjunto adicional para regiones de 80 nucleobases de longitud, en una secuencia objetivo de 100 nucleobases de longitud, que comienza en la posición 1 de la secuencia de nucleobases objetivo, puede describirse usando la siguiente expresión:

30

$$S(80) = \{R_{1,80} | n \in \{1,2,3,...,21\}\}$$

y describe el conjunto de regiones que comprende las nucleobases 1-80, 2-81, 3-82, 4-83, 5-84, 6-85, 7-86, 8-87, 9-88, 10-89, 11-90, 12-91, 13-92, 14-93, 15-94, 16-95, 17-96, 18-97, 19-98, 20-99, 21-100.

35

Así, en este ejemplo, A incluiría las regiones 1-8, 2-9, 3-10...93-100, 1-20, 2-21, 3-22...81-100, 1-80, 2-81, 3-82...21-100.

La unión de estos conjuntos de ejemplo antes mencionados y otros conjuntos para longitudes de 10 a 19 y de 21 a 79 pueden ser descritos utilizando la expresión matemática

$$A = \bigcup_m S(m)$$

donde $\cup$ representa la unión de los conjuntos obtenida combinando todos los miembros de todos los conjuntos.

40

Las expresiones matemáticas descritas aquí definen todas las regiones objetivo posible según una secuencia de nucleobases objetivo de cualquier longitud L , en donde las regiones de longitud m , y en donde m es mayor que o igual a 8 y menor que o igual a 80 nucleobases y , donde m es menor de L , y donde m es menor que $L-m+1$.

El efecto global de interferencia con la función ARNm es la modulación de la expresión de STAT3. En el contexto de esta invención "modulación" significa cualquier inhibición o estimulación; esto es, bien sea un descenso o incremento en la expresión. Esta modulación puede ser medida de maneras que son de rutina en la técnica, por ejemplo, la prueba de transferencia Northern de la expresión de ARNm, o PCR de transcriptasa reversa, como se enseña en los ejemplos de la presente invención o mediante transferencia Western o ensayo ELISA de la expresión de proteínas, o por un ensayo de transferencia de la expresión de proteínas. Los efectos sobre la proliferación celular o el crecimiento de células tumorales también pueden medirse, como se enseña en los ejemplos de la presente solicitud. La inhibición se prefiere actualmente.

Además de los efectos antisentido bien conocidos de los oligonucleótidos, también se ha encontrado que los análogos de nucleótidos que tienen al menos un enlace fosforotioato pueden inducir la estimulación de una respuesta inmune local. Esto se describe en la Patente de los Estados Unidos 5, 663,153. Este efecto inmunoestimulador no parece estar relacionado con ningún efecto antisentido el cual estos análogos de oligonucleótidos pueden o pueden no poseer. Estos análogos de oligonucleótidos son útiles como inmunopotenciadores, bien sea solos o en combinación con otras modalidades terapéuticas, tales como fármacos, particularmente fármacos antiinfecciosos y anticáncer, y procedimientos quirúrgicos para incrementar la eficacia. Además, los efectos antiinfecciosos y anticáncer ya poseídos por ciertos análogos de oligonucleótidos antisentido son potenciados a través de tal estimulación inmune.

También se ha encontrado que los análogos de oligonucleótidos que tienen al menos un enlace fosforotioato pueden ser utilizados para inducir la estimulación de una respuesta inmune sistémica o humoral. Así, estos oligonucleótidos útiles como inmunopotenciadores de una respuesta a anticuerpos, bien sea solos o en combinación con otras modalidades terapéuticas. Esto se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 5, 663,153.

Se cree actualmente, por lo tanto, que además de los efectos antisentido de los oligonucleótidos direccionados a STAT3, los oligonucleótidos que contienen al menos un enlace de esqueleto fosforotioato pueden ser útiles en la iniciación de una respuesta inmune que puede agregarse al "efecto supresor" antitumoral ya observado con inhibidores negativos dominantes de la señalización de STAT3 (Niu et al., Cancer Res., 1999, 59, 5059-5063). Se cree que este efecto está relacionado con infiltración tumoral por células inflamatorias agudas y crónicas las cuales pueden participar en la matanza de células tumorales residuales. Así los efectos terapéuticos de los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 pueden ser potenciados por las propiedades inmunoestimuladoras de los oligonucleótidos mismos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden no ser direccionados a STAT3 pero los que contienen al menos una unión de esqueleto fosforotioato pueden ser utilizados como adyuvantes en combinación con antisentido u otros inhibidores de STAT3.

Los oligonucleótidos de esta invención pueden ser utilizados en diagnóstico, terapia, profilaxis y como reactivos de investigación y en kits. Puesto que los oligonucleótidos de esta invención hibridan a ácidos nucleicos que codifican STAT3, pueden construirse pruebas sándwich, colorimétricas y otras para explotar este hecho. La provisión de medios para detectar la hibridación de oligonucleótidos con el gen STAT3 o ARNm pueden lograrse de manera rutinaria. Tal previsión puede incluir la conjugación de enzimas, radiomarcación o cualquier otro sistema de detección adecuado. También puede prepararse kits para detección de la presencia o ausencia de STAT3.

La presente invención también es adecuada para diagnosticar estados inflamatorios anormales o ciertos cánceres en tejidos u otras muestras de pacientes de quienes se sospecha que tienen una enfermedad inflamatoria tal como artritis reumatoide o cánceres tales como cáncer de seno, cerebro o cabeza y cuello, melanomas, mielomas, leucemias y linfomas.

Puede formularse un cierto número de ensayos que comúnmente comprometen el contacto de una muestra de tejido con un oligonucleótido de la invención bajo condiciones seleccionadas para permitir la detección y, usualmente, la cuantificación de tal inhibición. En el contexto de esta invención, "poner en contacto" tejidos o células con un oligonucleótido u oligonucleótidos significa agregar los oligonucleótidos, usualmente en un vehículo líquido, a una suspensión celular o muestra de tejido, bien sea *in vitro* o *ex vivo*, o administrar los oligonucleótidos a las células o tejidos dentro de un animal.

Los oligonucleótidos de esta invención también pueden ser usados para propósitos de investigación. Así, la hibridación específica exhibida por los oligonucleótidos puede ser utilizada para ensayos, purificaciones, preparaciones de productos celulares y en otras metodologías que pueden ser apreciadas por personas de experiencia normal en la técnica.

En el contexto de esta invención, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases de origen natural, azúcares y uniones interazúcar covalentes (esqueleto) así como oligonucleótidos que tienen porciones de origen no natural que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son preferidos frecuentemente sobre las formas naturales por propiedades deseables tales como, por ejemplo, consumo celular potenciado, enlazamiento potenciado a un objetivo y estabilidad incrementada en la presencia de nucleasas.

- Los compuestos antisentido de acuerdo con esta divulgación comprenden preferiblemente desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleobases (esto es, desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 80 nucleósidos enlazados). Una persona de experiencia normal en la técnica apreciará que la divulgación abarca compuestos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o 80 de nucleobases en longitud.
- En una realización, los compuestos antisentido de la invención son de 12 a 50 nucleobases de longitud. Una persona que tenga experiencia normal en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 nucleobases de longitud.
- En una realización, los compuestos antisentido de la invención son de 13 a 40 nucleobases de longitud. Una persona que tenga experiencia normal en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleobases de longitud.
- En otra realización, los compuestos antisentido de la invención son de 15 a 30 nucleobases de longitud. Una persona de experiencia normal en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleobases de longitud.
- En una realización, los compuestos antisentido de la invención son de 19 a 25 nucleobases de longitud. Una persona de experiencia normal en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleobases de longitud.
- En otra realización, los compuestos antisentido de la invención son de 19 a 21 nucleobases de longitud. Una persona de experiencia normal en la técnica apreciará que esto abarca compuestos de 19, 20 o 21 nucleobases de longitud.
- Tal como se utiliza aquí, el término “compuesto oligomérico” se define como un compuesto polimérico que comprende sustancialmente subunidades monoméricas con base en ácidos nucleicos. Compuestos oligoméricos incluyen oligonucleótidos y sus análogos, imitadores o mimetizadores.
- Mientras que la forma preferida del compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido de cadena sencilla, en muchas especies la introducción de estructuras de cadena doble, tales como moléculas de ARN de cadena doble (ARNds), ha demostrado inducir una reducción potente y mediada por antisentido específica de la función de un gen o sus productos genéticos asociados. Este fenómeno ocurre tanto en plantas como en animales y se cree que tiene una conexión evolutiva con la defensa viral y el silenciamiento de transposones.
- La primera evidencia de que el ARNds podría llevar al silenciamiento de genes en animales apareció en 1995 a partir del trabajo en el nematodo, *Caenorhabditis elegans* (Guo y Kempheus, Cell, 1995, 81, 611-620). Montgomery et al., han demostrado que los efectos de interferencia primarios del ARNds son postranscripcionales (Montgomery et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95, 15502-15507). El mecanismo antisentido postranscripcional definido en *Caenorhabditis elegans* resultante de la exposición a ARN de doble cadena (ARNds) ha sido designado desde entonces interferencia ARN (iARN). Este término ha sido generalizado para significar un silenciamiento de genes mediado por antisentido que involucra la introducción de ARNds que lleva a la reducción específica para la secuencia de niveles de ARNm direccionados endógenos (Fire et al., Nature, 1998, 391, 806-811). Recientemente, se ha demostrado que es, en efecto, los oligómeros de ARN de cadena sencilla de la polaridad de antisentido de los ARNds los que son inductores potentes de iARN (Tijsterman et al., 2002, 295, 694-697). También se contempla el uso de estas moléculas de ARN de cadena doble (ARN o ARNsi de interferencia corta) para direccionamiento e inhibición de la expresión de ARNm de STAT3. Estas moléculas de ARN de cadena doble apuntan a regiones similares a las apuntadas por oligonucleótidos antisentido y tienen efectos similares. Estas moléculas de ARN de cadena doble tienen generalmente 19 – 21 pares de bases de longitud, pero pueden variar entre 8 y 50 nucleobases. La producción de moléculas de ARNsi está descrita en un sentido general en los ejemplos previstos más abajo, pero será apreciado que cualquier ARNsi deseado direccionado a STAT3 puede ser sintetizado por técnicas convencionales de síntesis de oligonucleótidos. Una vez que la secuencia de la cadena antisentido es conocida, se sintetiza la cadena de sentido complementario. Las cadenas sentido y antisentido se combinan entonces para formar el ARNsi.
- Modificaciones de oligómeros y monómeros
- Como es conocido en la técnica, un nucleósido es una combinación base-azúcar. La porción base del nucleósido normalmente es una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen adicionalmente un grupo fosfato enlazado covalentemente a la porción azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentafuranosilo, el grupo fosfato puede estar enlazado bien sea en la unidad estructural hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato enlazan covalentemente los nucleósidos adyacentes a otra forma para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de este compuesto

polimérico lineal pueden ser unidos adicionalmente para formar un compuesto circular, sin embargo, los compuestos lineales son preferidos en general. Además, los compuestos lineales pueden tener complementariedad de nucleobases interna y pueden por lo tanto plegarse de una manera que produce un compuesto total o parcialmente de cadena doble. Dentro de los oligonucleótidos los grupos fosfato son denominados comúnmente como formadores del enlaces internucleósido o en conjunción con el anillo de azúcar del esqueleto del oligonucleótido. El enlace internucleósido normal que constituye el esqueleto de la ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

Enlaces internucleósido modificados

Ejemplos específicos de compuestos oligoméricos antisentido preferidos útiles en esta invención incluyen oligonucleótidos que contienen enlaces internucleósido modificados, por ejemplo de origen no natural. Como se define en esta especificación, los oligonucleótidos que tienen enlaces internucleósidos modificados incluyen enlaces internucleósido que retiene un átomo de fósforo y enlaces internucleósido que no tienen un átomo de fósforo. Para los propósitos de esta especificación, y como se referencia algunas veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido también pueden ser considerados como oligonucleósidos.

En el sistema *C. elegans*, la modificación del enlace internucleótido (fosforotioato) no interfiere significativamente con la actividad del iARN. Con base en esta observación, se sugiere que ciertos compuestos oligoméricos de la invención pueden tener también uno o más enlaces internucleósido modificados. Un enlace internucleósido modificado que contiene fósforo preferido es el enlace internucleósido fosforotioato.

Los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos que contienen un átomo de fósforo en los mismos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fósforo-ditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilo fosfotriésteres, fosfanatos de metilo y otros alquilos incluyendo fosfonatos de 3'-alquileo, fosfonatos de 5'-alquileo y fosfonatos quirales, fosinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilo fosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces normales 3' - 5', análogos enlazados 2' - 5' de estos, y aquellos que tengan polaridad invertida en donde uno o más enlaces internucleótidos son un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un enlace 3' a 3' sencillo en el enlace de internucleótido más cercano a 3', esto es un residuo nucleósido invertido individual el cual puede ser abásico (la nucleobase falta o tiene un grupo hidroxilo en lugar de la misma). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas ácido libres.

Patente de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los anteriores enlaces que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, US.: 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 y 5,625,050.

En realizaciones más preferidas de la invención, los compuestos oligoméricos tienen uno o más enlaces internucleósido fosforotioato y/o heteroátomo, en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [conocido como esqueleto metilen (metilimino) o MMI], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [en donde el enlace internucleótido fosfodiéster original es representado como -O-P(=O)(OH)-O-CH₂-]. Los enlaces internucleósido tipo MMI están divulgados en la Patente de los Estados Unidos mencionada antes 5, 489,677. Enlaces internucleósido amida preferidos están divulgados en la Patente de Estados Unidos antes citada 5, 602,240.

Esqueletos oligonucleótidos modificados preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos tienen esqueletos que son formados por enlaces internucleósido alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósido mixtos heteroátomo y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósido heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción azúcar de un nucleósido); esqueletos xilosano; esqueletos sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos formacetilo y tioformacetilo; esqueletos metilen formacetilo y tioformacetilo; esqueletos riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos sulfamato; esqueletos metilen imino y metilen hidrazino; esqueletos sulfonato y sulfonamida; esqueletos amida; y otros que tienen partes componentes mixtas N, O, S y CH₂.

Patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a US.: 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 y 5,677,439.

Imitadores de oligonucleótidos

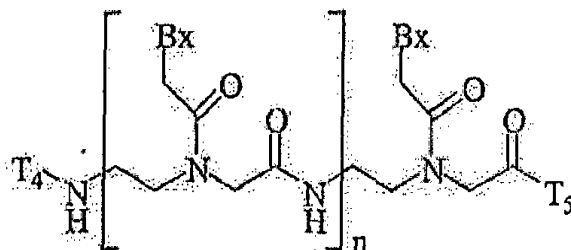
Otro grupo de compuestos de la presente invención incluye imitadores de oligonucleótidos. El término imitador según se aplica a los oligonucleótidos pretende incluir compuestos oligoméricos en donde solamente el anillo furanosa o tanto el anillo furanosa como la unión internucleótidos son reemplazados con grupos novedosos, en reemplazo del grupo del anillo furanosa solamente también se denomina en la técnica como subrogado de azúcar.

La unidad estructural base heterocíclica o una unidad estructural base heterocíclica modificada se mantiene para hibridación con un ácido nucleico objetivo apropiado. Un tal compuesto oligomérico, un imitador de oligonucleótido que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación se denomina como ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos oligoméricos PNA, el esqueleto azúcar de un oligonucleótido es reemplazado con un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto aminoetilglicina. Las nucleasas son retenidas y se enlazan directamente o indirectamente a los átomos de nitrógeno asa de la porción amida del esqueleto. Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos oligoméricos PNA incluyen, pero no se limitan a US.: 5, 539,082; 5, 714,331; y 5, 719,262.

Puede encontrarse enseñanza adicional de compuestos oligoméricos PNA en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Un imitador de oligonucleótido que ha sido reportado por tener propiedades de hibridación excelentes es un ácido nucleico peptídico (PNA). El esqueleto de los compuestos PNA es dos o más unidades aminotilglicina enlazadas lo cual da al PNA un esqueleto que contiene amida. Las unidades estructurales base heterocíclicas están enlazadas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida del esqueleto. Patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos PNA incluyen, pero no se limitan a US.: 5, 539,082; 5, 714,331; y 5, 719,262. Enseñanzas adicionales sobre compuestos PNA pueden encontrarse en Nielsen et al., Science, 1991, 1497-1500.

Los PNA han sido modificados para incorporar numerosas modificaciones puesto que la estructura PNA básica fue preparada primero. La estructura básica se muestra a continuación:



en donde

Bx es una unidad estructural de base heterocíclica;

T₄ es hidrógeno, un grupo protector de amino, -C(O)R₅, alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, alquino C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, un grupo químico funcional, un grupo informador, un grupo conjugado, un D o L α-aminoácido enlazado a través del grupo α-carboxilo u opcionalmente a través del grupo ω-carboxilo cuando el aminoácido es ácido aspártico o ácido glutámico o un péptido derivado de aminoácidos D o L o mixtos D y L enlazados a través de un grupo carboxilo, en donde los grupos sustituyentes s son seleccionados de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino;

T₅ es -OH, -N(Z₁)Z₂, R₅, D o L α-aminoácido enlazado a través del grupo α-amino u opcionalmente a través del grupo ω-amino cuando el aminoácido es lisina o ornitina o un péptido derivado de aminoácidos D o L o mixtos D y L enlazados a través de un grupo amino, un grupo químico funcional, un grupo informador o un grupo conjugado;

Z₁ es hidrógeno, C₁-C₆ alquilo, o un grupo protector de amino;

Z₂ es hidrógeno, C₁-C₆ alquilo, un grupo protector de amino, -C(=O)-(CH₂)_n-J-Z₃, un D o L α-aminoácido enlazado a través del grupo α-carboxilo u opcionalmente a través del grupo ω-carboxilo cuando el aminoácido es ácido aspártico o ácido glutámico o un péptido derivado de D, L o aminoácidos D o L o mixtos D y L enlazados a través de un grupo carboxilo;

Z₃ es hidrógeno, un grupo protector de amino, -C₁-C₆ alquilo, -C(=O)-CH₃, bencilo, benzoilo, o - (CH₂)_n-N(H) Z₁;

cada J es O, S o NH;

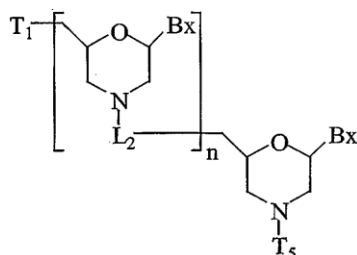
R₅ es un grupo protector de carbonilo; y

n es desde 2 hasta aproximadamente 50.

Otra clase de imitador de oligonucleótidos que ha sido estudiada está basada en unidades morfolino enlazadas (ácido morfolino nucleico) que tiene bases heterocíclicas unidas al anillo morfolino. Se ha reportado un cierto número de grupos enlazantes que enlazan las unidades monoméricas morfolino en un ácido morfolino nucleico. Una clase preferida de grupos enlazantes ha sido seleccionada para dar un compuesto oligomérico no iónico. Los compuestos

oligoméricos no iónicos basados en morfolino tienen probablemente menos interacciones indeseadas con las proteínas celulares. Los compuestos oligoméricos basados en morfolino son imitadores no iónicos de oligonucleótidos que menos probablemente forman interacciones indeseadas con proteínas celulares (Dwayne A. Braasch y David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510). Los compuestos oligoméricos basados en morfolino son divulgados en la Patente de los Estados Unidos 5,034,506 concedida el 23 de julio de 1991. La clase morfolino de compuestos oligoméricos ha sido preparada con una variedad de grupos enlazantes uniendo las subunidades monoméricas.

Se han preparado ácidos morfolino nucleicos que tienen una variedad de diferentes grupos enlazantes (L_2) que unen las subunidades monoméricas. La fórmula básica se muestra a continuación:



en donde

T_1 es hidroxilo o un hidroxilo protegido;

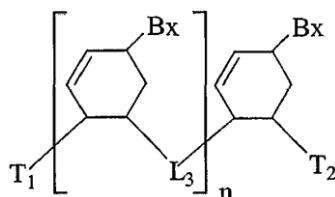
T_5 es hidrógeno o un fosfato o un derivado de fosfato;

L_2 es un grupo enlazante; y

n es desde 2 hasta aproximadamente 50.

Una clase adicional de imitador de oligonucleótidos se denomina como ácidos ciclohexenilo nucleicos (CeNA). El anillo furanosa presente normalmente en una molécula de ADN/ARN es reemplazado con un anillo ciclohexenilo. Los monómeros CeNA DMT protegidos con fosforamidita han sido preparados y usados para la síntesis de compuestos oligoméricos siguiendo la química de fosforamidita clásica. Los compuestos oligoméricos de CeNA modificados y oligonucleótidos que tienen posiciones específicas modificadas con CeNA han sido preparados y estudiados (véase Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122, 8595-8602). En general la incorporación de monómeros CeNA en una cadena de ADN incrementa su estabilidad de un híbrido de ADN/ARN. Los oligoadenilatos de CeNA forman complejos con complementos de ARN y ADN con estabilidad similar a los complejos originales. El estudio de la incorporación de estructuras CeNA en estructuras de ácidos nucleicos naturales fue demostrado por RMN y dicroísmo circular para proceder con una adaptación conformacional fácil. Adicionalmente la incorporación de CeNA en un ARN de direccionamiento de secuencia fue estable al suero y capaz de activar la *E. coli* ARNasa dando como resultado la escisión de la cadena de ARN objetivo.

La fórmula general de CeNA se muestra a continuación:



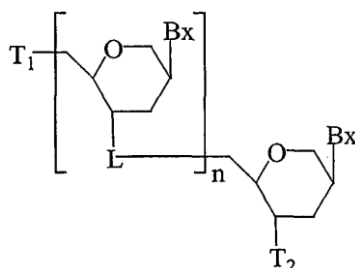
en donde

cada Bx es una unidad estructural de base heterocíclica;

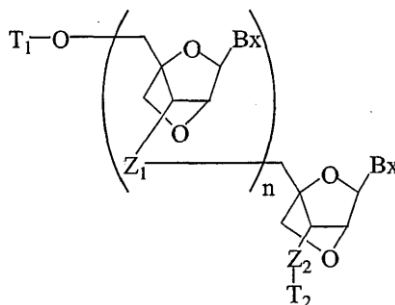
T_1 es hidroxilo o un hidroxilo protegido; y

T_2 es hidroxilo o hidroxilo protegido.

Otra clase de imitador de oligonucleótidos (ácido anhidrohexitol nucleico) puede prepararse a partir de uno o más nucleósidos anhidrohexitol (véase Wouters y Herdewijn, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, 9, 1563-1566) y tendrían la fórmula general:



Una modificación preferida adicional incluye Ácidos Nucleicos Asegurados (LNA) en los cuales el grupo 2'-hidroxilo está enlazado al átomo de carbono 4' del anillo del azúcar formando por lo tanto un enlace 2'-C, 4'-C-oximetileno formando por lo tanto una unidad estructural azúcar bicíclica. El enlace es preferiblemente un grupo metileno (-CH₂-)_n que enlaza el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en donde n es 1 o 2 (Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456). Los LNA y los análogos de LNA despliegan estabilidades térmicas dúplex muy altas con complementariedad de ADN y ARN (T_m = +3 a +10 C), estabilidad hacia la degradación 3'-exonucleolítica y buenas propiedades de solubilidad. La estructura básica de los LNA mostrando el sistema de anillo bicíclico se muestra a continuación:



Las conformaciones de los LNA determinadas por espectroscopía RMN 2D han demostrado que la orientación asegurada de los nucleótidos de LNA, tanto en LNA de cadena sencilla como en dúplex, restringe el esqueleto de fosfato de tal manera que introduce una población más alta de la conformación tipo N (Peterson et al., J. Mo. Recognit., 200, 13, 44-53). Estas conformaciones están asociadas con un apilamiento mejorado de las nucleobases (Wengel et al., Nucleosides Nucleótidos, 1999, 18, 1365-1370).

Los LNA han demostrado formar dúplex LNA:LNA excesivamente estables (Koshkin et al., J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 13252-13253). Se demostró que la hibridación LNA:LNA era el sistema dúplex tipo ácido nucleico más estable térmicamente, y el carácter imitador de ARN de los LNA fue establecido a nivel de dúplex. La introducción de tres monómeros de LNA (T o A) incrementó significativamente los puntos de fusión (T_m = +15/+11) hacia los complementos de ADN. La universalidad de la hibridación mediada por LNA ha sido cuestionada por la formación de dúplex LNA:LNA excesivamente estable. La imitación de ARN de los LNA fue reflejada con respecto a la restricción conformacional tipo N de los monómeros y a la estructura secundaria del dúplex LNA:ARN.

Los LNA también forman dúplex con ADN, ARN o LNA con afinidades térmicas altas. Los espectros de dicroísmo circular (CD) muestran que los dúplex que involucran LNA modificado completamente (esp. LNA:ARN) recuerda estructuralmente un dúplex ARN:ARN de forma A. Un examen por resonancia magnética nuclear (RMN) de un dúplex LNA:ADN confirmó la conformación 3' endo de un monómero LNA. El reconocimiento de ADN de cadena doble también ha sido demostrado sugiriendo la invasión de cadena por el LNA. Estudio de secuencias no coincidentes muestra que los LNA obedecen las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick con una selectividad en general mejorada en comparación con las cadenas de referencia no modificadas correspondientes.

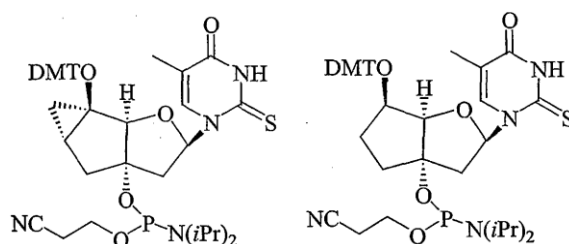
Tipos novedosos de compuestos oligoméricos de LNA, así como los LNA, son útiles en un amplio rango de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. Entre estas están las aplicaciones antisentido, las aplicaciones PCR, los oligómeros para desplazamiento de cadena, sustratos para polimerasas de ácidos nucleico y generalmente como fármacos basados en nucleótidos. Se han descrito oligonucleótidos antisentido potentes y no tóxicos que contienen LNA (Wahlested et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638). Los autores han demostrado que los LNA confieren varias propiedades deseadas a agentes antisentido. Los copolímeros LNA/ADN no fueron degradados rápidamente en suero sanguíneo y en extractos celulares. Los copolímeros LNA/ADN exhibieron potente actividad antisentido en sistemas de prueba tan diversas como señalizaciones al receptor acoplado a proteínas G en cerebro de ratas vivas y detección de genes informadores en *Escherichia coli*. La administración eficiente mediada por LIPOFECTINTM de LNA en células de cáncer de seno humano vivas también fue lograda.

Han sido descritas la síntesis y preparación de los monómeros LNA de adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización, y las propiedades de reconocimiento de ácido nucleico (Koshkin et al.,

Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). Los LNA y la preparación de los mismos también fueron descritas en WO 98/39352 y WO 99/14226.

También han sido preparados los primeros análogos de LNA, fosforotioato-LNA y 2'-tio-LNA (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También ha sido descrita la preparación de análogos de nucleósidos asegurados que contienen dúplex oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para polimerasas de ácido nucleico (Wengel et al., solicitud Internacional PCT WO 98-DK393 19980914). Adicionalmente, se ha descrito la síntesis de 2'-amino-LNA, un novedoso oligonucleótido de alta afinidad conformacionalmente restringido con un asa (Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se ha preparado 2'-amino- y 2'-metilamino-LNA y se ha reportado previamente la estabilidad térmica de sus dúplex con cadenas de complementariedad de ARN y ADN.

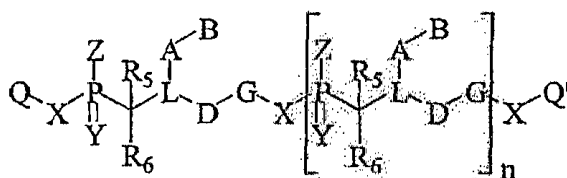
Se han preparado imitadores de oligonucleótidos adicionales para incluir análogos de nucleósidos bicíclicos y tricíclicos que tiene las fórmulas (se muestran monómeros de amidita):



(véase Steffens et al., *Helv. Chim. Acta*, 1997, 80, 2426-2439; Steffens et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 3249-3255; y Renneberg et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 5993-6002). Estos análogos de nucleósidos modificados han sido oligomerizados utilizando la metodología de fosforamidita y los compuestos oligoméricos resultantes que contienen análogos de nucleósidos tricíclicos han demostrado estabilidades térmicas incrementadas (T_m) cuando se hibridan a ADN, ARN y así mismos. Los compuestos oligoméricos que contienen análogos de nucleósidos bicíclicos han demostrado estabilidades térmicas que se aproximan a las de los dúplex de ADN.

Otra clase de imitador de oligonucleótido se denomina como ácidos nucleicos fosfomonoésteres incorporan un grupo fósforo en un esqueleto. Se reporta que esta clase de imitador de oligonucleótido tiene propiedades físicas y biológicas y farmacológicas útiles en las áreas de la inhibición de expresión genética (oligonucleótidos antisentido, ribozimas, oligonucleótidos en sentido y oligonucleótidos formadores de tripletes), como son los usados para la detección de ácidos nucleicos y como auxiliares para uso en biología molecular.

La fórmula general (para definición de las variables de Markush véase: Patente de los Estados Unidos 5,874,553 y 6.127.346) se muestra a continuación.



Se ha reportado otro imitador de oligonucleótidos en donde el anillo furanozilo ha sido reemplazado por una unidad estructural ciclobutilo.

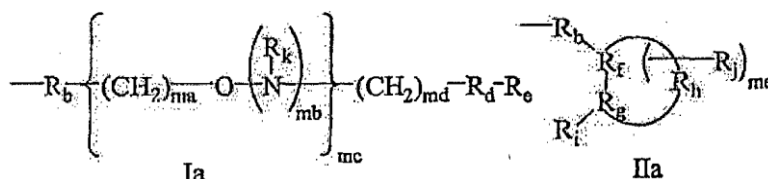
Azúcares modificados

Compuestos oligoméricos de la invención también pueden contener una o más unidades estructurales azúcar. Compuestos oligoméricos preferidos incluyen un grupo sustituyente azúcar seleccionado de: OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ alquilo o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituidos o no sustituidos. Particularmente preferidos son O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y CH₂nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden un grupo sustituyente azúcar seleccionado de: alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo inferiores sustituidos, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo ARN de escisión, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504) i.e., un grupo alcoxicoxi. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi. i.e., un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también

conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos aquí más adelante, y 2'-dimetilamino-etoxietoxi (también conocido en el arte como 2'-O-dimetil-amino-etoxi-etilo o 2'-DMAEOE), i.e., 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂.

Otros grupos sustituyentes de azúcar preferidos incluyen metoxi (-O-CH₃), aminopropoxi (-OCH₂CH₂CH₂NH₂), alilo (-CH₂-CH=CH₂), -O-alilo (-O-CH₂-CH=CH₂) y fluoro (F). Grupos sustituyentes 2'-azúcar pueden estar en la posición arábino (arriba) o posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arábino preferida es 2'-F. Pueden hacerse también modificaciones similares en otras posiciones del compuesto oligomérico, particularmente en la posición 3' del azúcar sobre el nucleósido 3' terminal o en oligonucleótidos enlazados en 2' - 5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los compuestos oligoméricos también pueden tener imitadores de azúcar tales como unidades estructurales ciclobutilo en lugar del azúcar pentafuranozilo. Patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, US: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; y 5,700,920.

Grupos sustituyentes azúcar representativos adicionales incluyen grupos de fórmula Ia o IIa:

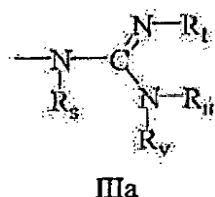


en donde

R_b es O, S o NH;

R_d es un enlace sencillo, O, S o C(=O);

R_e es C₁-C₁₀ alquilo, N(R_k)(R_m), N(R_k)(R_n), N=C(R_p)(R_q), N=C(R_p)(R_r) o tiene la fórmula IIIa;



R_p y R_q son cada uno independientemente hidrógeno o C₁-C₁₀ alquilo;

R_r es -R_x-R_y;

cada R_s, R_c, R_u y R_v es, independientemente, hidrógeno, C(O)R_w, alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, alquino C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, alquilsulfonilo, arilsulfonilo, un grupo químico funcional o un grupo conjugado, en donde los grupos sustituyentes son seleccionados de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y alquino; u opcionalmente, R_u y R_v forman juntos una unidad estructural ftalimido con el átomo de nitrógeno al cual están unidos; cada R_w es, independientemente, alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, trifluorometilo, cianoetilo, metoxi, etoxi, t-butoxi, alilo, 9-fluorenilmetoxi, 2-(trimetilsilil)-etoxi, 2,2,2-tricloroetoxi, benciloxi, butirilo, iso-butirilo, fenilo o arilo;

R_k es hidrógeno, un grupo protector de nitrógeno o -R_x-R_y;

R_p es hidrógeno, un grupo protector de nitrógeno o -R_x-R_y;

R_x es un enlace o una unidad estructural enlazante;

R_y es un grupo químico funcional, un grupo conjugado o un medio sólido de soporte;

cada R_m y R_n es, independientemente, H, un grupo protector de nitrógeno, C₁-C₁₀ alquilo sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, alquino C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, en donde los grupos sustituyentes son seleccionados de hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno, alquino; NH₃⁺, N(R_u)(R_v), guanidino y acilo donde dicho acilo es una amida o un éster de ácido;

o R_m y R_n, juntos, son un grupo protector de nitrógeno, están unidos en una estructura de anillo que incluye opcionalmente un heteroátomo adicional seleccionado de N y O o son un grupo químico funcional;

R_i es OR_z , SR_z , o $N(R_z)_2$;

cada R_z es, independientemente, H, C_1 - C_8 alquilo, C_1 - C_8 haloalquilo, $C(=NH)N(H)R_u$, $C(=O)N(H)R_u$ o $OC(=O)N(H)R_u$;

R_f , R_g y R_h comprenden un sistema de anillo que tiene desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 7 átomos de carbono o que tiene desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos en donde dichos heteroátomos son seleccionados de oxígeno, nitrógeno y azufre en donde dicho sistema de anillos alifático, alifático insaturado, aromático, o heterocíclico saturado o no saturado;

R_j es alquilo o haloalquilo que tiene de 1 a 10 átomos de carbono, alquenilo que tiene de 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, alquinilo que tiene de 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, alilo que tiene de 6 a aproximadamente 14 átomos de carbono, $N(R_k)$ (R_m) OR_k , halo, SR_k o CN;

m_a es 1 hasta aproximadamente 10;

cada m_b es, independientemente, 0 o 1;

m_c es 0 o un entero de 1 a 10;

m_d es un entero de 1 a 10;

m_e es de 0, 1 o 2; y

con la condición de que cuando m_c es 0, m_d es mayor que 1.

Grupos sustituyentes representativos de la fórmula I están divulgados en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie No. 09/130,973, presentada el 7 de agosto de 1998, titulada "2'-Oxietoxi Oligonucleótidos cubiertos".

Grupos sustituyentes cíclicos representativos de la fórmula II se divulgan en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Serie No. 09/123,108, presentada el 27 de julio de 1998, titulada "Compuestos 2'-Oligoméricos direccionados a ARN que son preorganizados conformacionalmente".

Grupos sustituyente azúcar preferidos particularmente incluyen $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, en donde n y m van de 1 a aproximadamente 10.

Grupos guanidinos sustituyentes representativos que se muestran en las fórmulas III y IV son divulgados en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos coposeída 09/349,040, titulada "Oligómeros funcionalizados", presentada el 7 de julio de 1999.

Grupos sustituyentes acetamido representativos están divulgados en la Patente de los Estados Unidos 6,147,200 la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Grupos sustituyentes dimetilaminoetiloxietilo representativos están divulgados en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US99/17895, titulada "Compuestos oligoméricos de 2'-O-Dimetilaminoetiloxietilo", presentada el 6 de agosto de 1999.

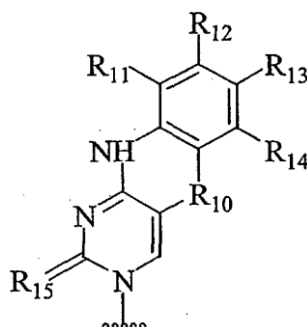
Nucleobases modificadas/nucleobases de origen natural

Los compuestos oligoméricos pueden incluir también nucleobases (denominadas frecuentemente en la técnica simplemente como "bases" o "unidad estructural de base heterocíclica") con modificaciones o sustituciones. Tal como se utiliza aquí, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas también denominadas aquí como unidades estructurales de bases heterocíclicas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilo citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo ($-C\equiv C-CH_3$) uracilo y citosina y otros derivados alquílicos de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracil), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

Unidades estructurales de bases heterocíclicas pueden incluir también aquellas en las cuales la base purínica o pirimidínica es reemplazada con otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Nucleobases adicionales incluyen aquellas descritas en la Patente de los Estados Unidos No. 3,687,808, las divulgadas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990, las divulgadas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y las divulgadas por Sanghvi, Y.S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son

particularmente útiles para el incremento de la afinidad de enlazamiento de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropil-adenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones en 5-metilcitosina han demostrado incrementar la estabilidad dúplex de ácidos nucleicos en 0.6 - 1.2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research y Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son actualmente sustituciones en bases preferidas, incluso más particularmente en combinaciones con 2'-O-metoxietilo azúcares.

En un aspecto de la presente invención, se preparan compuestos oligoméricos que tienen compuestos heterocíclicos policíclicos en lugar de una o más unidades estructurales de bases heterocíclicas. Un cierto número de compuestos heterocíclicos tricíclicos han sido reportados previamente. Estos compuestos son utilizados rutinariamente en aplicaciones antisentido para incrementar las propiedades de enlazamiento de la cadena modificada a una cadena objetivo. Las modificaciones más estudiadas están dirigidas a guanosinas por lo cual han sido denominadas pinzas G o análogos de citidina. Muchos de esos compuestos heterocíclicos policíclicos tienen la fórmula general:



Análogos de citosina representativos que tienen 3 enlaces de hidrógeno con una guanosina en una segunda cadena incluyen 1,3-diazafenoxazine-2-ona ($R_{10} = O$, $R_{11} - R_{14} = H$) [Kurchavov, et al., *Nucleosides y Nucleótidos*, 1997, 16, 1837-1846], 1,3-diazafenotiazine-2-ona ($R_{10} = S$, $R_{11} - R_{14} = H$), [Lin, K.-Y.; Jones, R. J.; Matteucci, M. J. *Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 3873-3874] y 6, 7, 8, 9-tetrafluoro-1,3-diazafenoxazine-2-ona ($R_{10} = O$, $R_{11} - R_{14} = F$) [Wang, J.; Lin, K.-Y.; Matteucci, M. *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 8385-8388]. Incorporadas en estos oligonucleótidos estas modificaciones en las bases demostraron hibridar con guanina complementaria y esta última también demostró hibridar con adenina y potenciar la estabilidad térmica helicoidal extendiendo las interacciones de apilamiento (véase también la solicitud de Patente de los Estados Unidos titulada "Ácidos nucleicos peptídicos modificados" presentada el 24 de mayo de 2002, número de serie 10/155,920; y Solicitud de Patente de los Estados Unidos titulada "Oligonucleótidos quiméricos resistentes a nucleasa" presentada el 24 de mayo de 2002, número de serie 10/013,295).

Se han observado propiedades estabilizadoras de la hélice adicionales cuando un análogo/sustituto de citosina tiene una unidad estructural aminoetoxi unida al andamio rígido 1,3-diazafenox-azina-2-ona ($R_{10} = O$, $R_{11} = -O-(CH_2)_2-NH_2$, $R_{12-14} = H$) [Lin, K.-Y.; Matteucci, M. J. *Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 8531-8532]. Estudios de enlazamiento demostraron que una incorporación individual podría potenciar la afinidad de enlazamiento de un oligonucleótido modelo a su ADN o ARN objetivo complementario con una ΔT_m de hasta 18° con respecto a la 5-metil citosina ($dC5^{me}$), el cual es el potenciamiento de afinidad más alto conocido para una modificación individual hasta ahora. Por otro lado, la ganancia en estabilidad helicoidal no compromete la especificidad de los oligonucleótidos. Los datos de T_m indican una discriminación aún mayor entre la coincidencia perfecta y las secuencias no coincidentes en comparación con $dC5^{ma}$. Se sugirió que el grupo amino enlazado sirve como enlace de hidrógeno adicional donante para interactuar con el lado Hoogsteen, a saber el O6, de una guanina complementaria formando por lo tanto 4 enlaces de hidrógeno. Esto significa que la afinidad incrementada de la pinza G es mediada por la combinación del apilamiento de bases extendido y el enlazamiento de hidrógeno específico adicional.

Compuestos heterocíclicos triciclos y métodos adicionales para utilizarlos que son compatibles con la presente invención están divulgados en la Patente de los Estados Unidos serie número 6, 028,183, la cual fue concedida el 22 de mayo de 2000, y la Patente de los Estados Unidos serie número 6,007,992.

La afinidad de enlazamiento potenciada de los derivados de fenoxacina junto con su especificidad de secuencia no comprometida los hace análogos de nucleobases valiosos para el desarrollo de fármacos basados en antisentido más potentes. En efecto, se han derivado datos prometedores de experimentos *in vitro* que demuestran que heptanucleótidos que contienen sustituciones de fenoxacina son capaces de activar la RNasaH, potenciar el consumo celular y exhibir una actividad antisentido incrementada [Lin, K.-Y.; Matteucci, M. J. *Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 8531-8532]. El potenciamiento de la actividad fue incluso más pronunciado en el caso de la pinza G, como una sustitución simple que demostró mejorar significativamente la potencia *in vitro* de un oligonucleótido de 2'-desoxifosforotioato 20mero [Flanagan, W. M.; Wolf, J.J.; Olson, P.; Grant, D.; Lin, K.-Y.; Wagner, R. W.; Matteucci, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 3513-3518]. No obstante, para optimizar el diseño de oligonucleótidos y

entender mejor el impacto de estas modificaciones heterocíclicas sobre la actividad biológica, es importante evaluar su efecto sobre la estabilidad a la nucleasa de los oligómeros.

Compuestos heterocíclicos policíclicos modificados adicionales útiles como bases heterocíclicas están divulgadas pero no se limitan a, en la antes anotada U.S. 3,687,808, así como en U.S.: 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,434,257; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,646,269; 5,750,692; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; y 5,681,941 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos número de serie 09/996,292 presentada el 28 de noviembre de 2001.

Los oligonucleótidos de la presente invención también incluyen variantes en los cuales una base diferente está presente en una o más de las posiciones de nucleótidos en el oligonucleótido. Por ejemplo, si el primer nucleótido es una adenosina, pueden producirse variantes que contienen timidina, guanosina o citidina en esta posición. Esto puede hacerse en cualquiera de las posiciones del oligonucleótido. Estos oligonucleótidos son probados entonces utilizando los métodos descritos aquí para determinar su capacidad de inhibir la expresión de STAT3.

Conjugados

Una sustitución preferida adicional que puede ser anexada a los compuestos oligoméricos de la invención involucra el enlazamiento de unas o más unidades estructurales o conjugadas que potencian la actividad, distribución celular o consumo celular de los compuestos oligoméricos resultantes. En una realización tales compuestos oligoméricos modificados se preparan uniendo covalentemente grupos conjugados a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo o amino. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilen glicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas en el contexto de esta invención, incluyen grupos que potencian el consumo de oligómeros, potencian la resistencia del oligómero a la degradación, y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con ARN. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran el consumo, distribución, metabolismo o excreción de oligómeros. Grupos conjugados representativos se divulgan en la Solicitud Internacional de Patente PCT/US 92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992. Unidades estructurales conjugadas incluyen pero no se limitan a unidades estructurales lipídicas tales como una unidad estructural colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo residuos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio, 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilen glicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleótidos, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), una unidad estructural palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o una unidad estructural octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

Los compuestos oligoméricos de la invención también pueden ser conjugados a sustancias farmacoactivas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, naproxeno, quetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dancilo sarcocina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación están descritos en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 09/334,130 (presentada el 15 de junio de 1999).

Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, U.S.: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941, cada uno de los cuales se incorpora aquí como referencia.

Los compuestos oligoméricos utilizados en la composición de la presente invención también pueden ser modificados para tener uno o más grupos estabilizadores que en general están unidos a uno o ambos terminales de los compuestos oligoméricos para potenciar las propiedades tales como por ejemplo estabilidad a la nucleasa. Incluidas en los grupos estabilizantes están las estructuras de cobertura. Por "estructura de cobertura o unidad estructural de cobertura terminal" se entienden modificaciones químicas que han sido incorporadas en cualquiera de los terminales

de los oligonucleótidos (véase por ejemplo Wincott et al., WO 97/26270). Estas modificaciones terminales protegen los compuestos oligoméricos que tienen moléculas de ácidos nucleicos terminales frente a la degradación por exonucleasas, y pueden ayudar en la administración y/o localización dentro de una célula. La cobertura puede estar presente en el terminal 5' (cobertura 5') o en el terminal 3' (cobertura 3') o puede estar presente en ambos terminales. En ejemplos no limitantes, la cobertura 5' incluye residuos abásicos invertidos (unidades estructurales), nucleótido 4', 5'-metileno; 1-(beta-D-eritrofuranosil) nucleótido, 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; L-nucleótidos; alfanucleótidos; nucleótido base modificado; enlace fosforoditioato; nucleótido treo-pentofuranosilo; nucleótido acíclico 3',4'-seco; nucleótido acíclico 3,4-dihidroxibutilo; ribonucleótido acíclico 3,5-dihidroxipentilo, unidad estructural nucleótido 3'-3'-invertido; unidad estructural abásica 3'-3'-invertida; unidad estructural nucleótido 3'-2'-invertida; unidad estructural abásica 3'-2'-invertida; 1,4-butanediol fosfato; 3'-fosforamidato; hexilfosfato; aminohexilo fosfato; 3'-fosfato; 3'-fosforotioato; fosforoditioato; o unidad estructural metilfosfonato con puente o sin puente (para más detalle véase Wincott et al., publicación Internacional PCT No. WO 97/26270).

Estructuras de cobertura 3' preferidas particularmente de la presente invención incluyen, por ejemplo 4', 5'-metileno nucleótido; 1-(beta-D-eritrofuranosil) nucleótido; 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; 5'-amino-alquilo fosfato; 1,3-diamino-2-propilo fosfato, 3-aminopropilo fosfato; 6-aminohexilo fosfato; 1,2-aminododecilo fosfato; hidroxipropilo fosfato; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; L-nucleótido; alfa-nucleótido; nucleótido base modificado; fosforoditioato; treo-pentofuranosilo nucleótido; nucleótido acíclico 3',4'-seco; 3,4-dihidroxibutilo nucleótido; 3,5-dihidroxipentilo nucleótido, unidad estructural nucleótido 5'-5'-invertida; unidad estructural abásica 5'-5'-invertida; 5'-fosforamidato; 5'-fosforotioato; 1,4-butanediol fosfato; 5'-amino; 5'-fosforamidato formador de puente y/o no formador de puente, fosforotioato y/o fosforoditioato, unidades estructurales metilfosfonato y 5'-mercapto formadoras o no formadoras de puente (para más detalle véase Beaucage y Tyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925).

Grupos estabilizantes 3' y 5' adicionales que pueden ser utilizados para cubrir uno o ambos extremos de un compuesto oligomérico para impartir estabilidad ante la nucleasa incluyen los divulgados en WO 03/004602 publicada el 16 de enero de 2003.

Compuestos oligoméricos quiméricos

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto oligomérico sean modificadas uniformemente, y en efecto más de una de las modificaciones antes mencionadas pueden ser incorporada en un compuesto oligomérico individual o incluso en una subunidad monomérico individual tal como un nucleósido dentro de un compuesto oligomérico. La presente invención también incluye compuestos oligoméricos que son compuestos oligoméricos quiméricos. Compuestos oligoméricos "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos oligoméricos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida de al menos una unidad monomérica, esto es, un nucleótido en el caso de un oligómero basado en ácido nucleico.

Los compuestos oligoméricos quiméricos contienen típicamente al menos una región modificada de tal manera que confieren resistencia incrementada a la degradación por nucleasa, consumo celular incrementado y/o afinidad de enlazamiento incrementada para el ácido nucleico objetivo. Una región adicional del compuesto oligomérico puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A manera de ejemplo, la RNasaH es una endonucleasa celular que escinde la cadena ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la RNasaH, por lo tanto, da como resultado la escisión del objetivo ARN, potenciando con ello grandemente la eficiencia de la inhibición de la expresión del gen. Consecuentemente, pueden obtenerse frecuentemente resultados comparables con compuestos oligoméricos más cortos cuando se usan quimeras, en comparación con por ejemplo la hibridación de desoxioligonucleótidos fosforotioato a la misma región objetivo. La escisión del ARN objetivo puede ser detectada rutinariamente por electroforesis en gel y, si es necesario, por técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociados conocidos en la técnica.

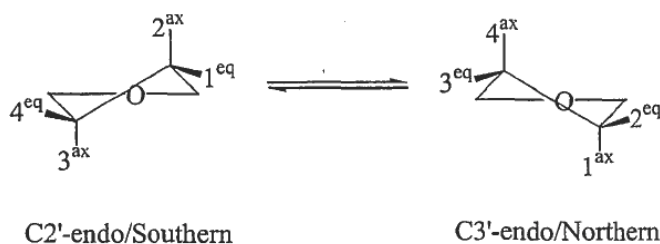
Los compuestos oligoméricos quiméricos de la invención pueden ser formados como estructuras compuestas de dos o más imitadores de oligonucleótidos, análogos de oligonucleótidos, oligonucleósidos y/ u oligonucleótidos como se describió anteriormente. Tales compuestos oligoméricos también han sido denominados en la técnica como hemímeros híbridos, oligómeros con brecha u oligómeros con brecha invertidos. Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas incluye, pero no se limitan a, US: 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; y 5,700,922.

Modificaciones endo en 3'

En un aspecto de la presente invención los compuestos oligoméricos incluyen nucleósidos modificados sintéticamente para inducir una conformación de azúcar 3' endo. Un nucleósido puede incorporar modificaciones sintéticas de la base heterocíclica, la unidad estructural azúcar o ambas para inducir una conformación de azúcar 3' endo deseada. Estos nucleósidos modificados son utilizados para imitar nucleósidos similares a ARN de tal manera que pueden potenciarse las propiedades particulares de un compuesto oligomérico a la vez que se mantiene la geometría conformacional 3' endo deseable.

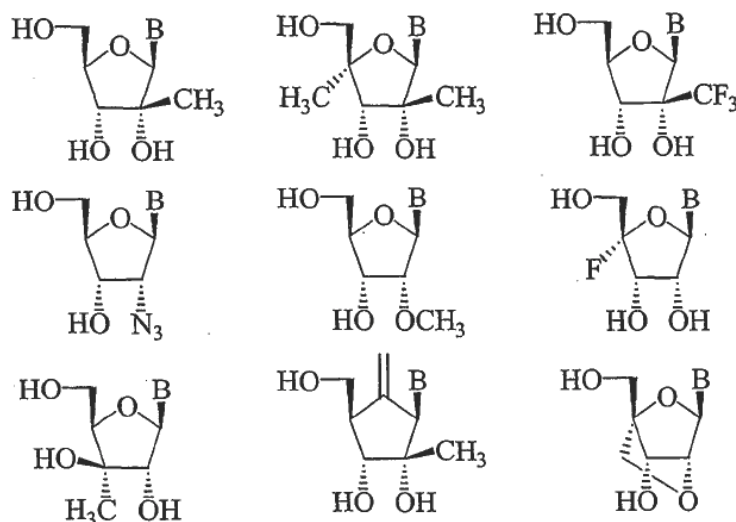
Hay una preferencia aparente para un dúplex tipo ARN (hélice en forma A, predominantemente 3' endo) como requerimiento (por ejemplo disparador) de la interferencia de ARN que es soportada en parte por el hecho de que los dúplex compuestos de 2'-desoxi-2'-F-nucleósidos parece eficiente en iniciar la respuesta de iARN en el sistema *C. elegans*. Las propiedades que son potenciadas por el uso de endonucleósidos 3' endo más estables incluyen pero no se limitan a modulación de propiedades farmacocinéticas a través de la modificación del enlazamiento a proteínas, disociación de proteína, absorción y eliminación; modulación de estabilidad a la nucleasa así como estabilidad química; modulación de la afinidad al enlazamiento y especificidad del oligómero (la afinidad y especificidad para enzimas así como para secuencias complementarias); e incremento de la eficacia de la escisión de ARN. La presente invención provee disparadores oligoméricos de ARN que tienen uno o más nucleósidos modificados de manera tal que favorecen la conformación tipo C3' endo.

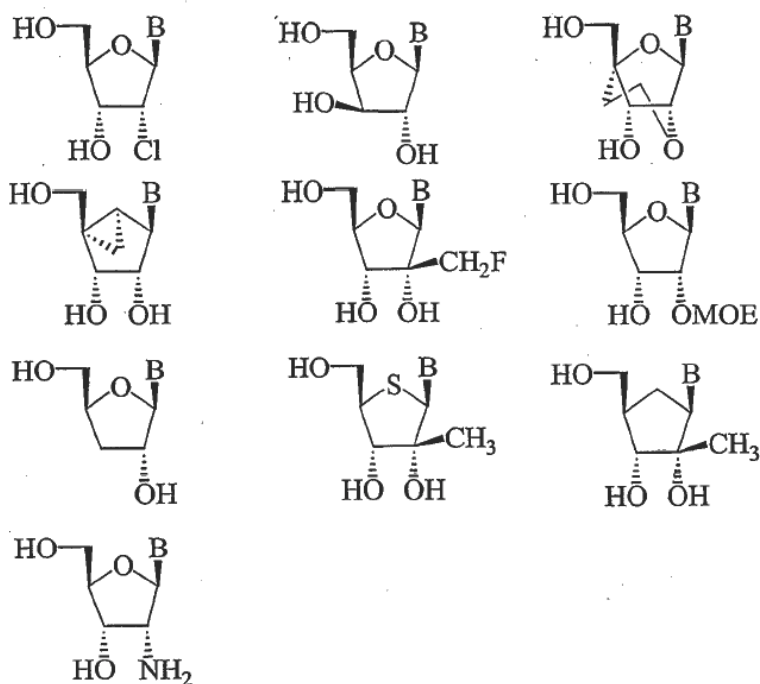
Esquema 1



La conformación de nucleósidos está influenciada por diversos factores que incluyen la sustitución en las posiciones 2', 3' o 4' del azúcar pentofuranosilo. Los sustituyentes electronegativos generalmente prefieren las posiciones axiales, mientras que los sustituyentes estéricamente exigentes prefieren generar las posiciones ecuatoriales (Principles of Nucleic Acid Structure, Wolfgang Sanger, 1984, Springer-Verlag.) la modificación de la posición 2' para favorecer la conformación 3' endo puede alcanzarse a la vez que se mantiene el 2'-OH como un elemento de reconocimiento, como se ilustra en la figura 2, más adelante. (Gallo et al., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713. Harry-O'kuru et al., J. Org. Chem., (1997), 62(6), 1754-1759 y Tang et al., J. Org. Chem. (1999), 64, 747-754.) Alternativamente, la preferencia de la conformación 3' endo puede alcanzarse por la eliminación del 2'-OH como se ejemplifica mediante los 2'-desoxi-2'-F-nucleósidos (Kawasaki et al., J. Med. Chem. (1993), 36, 831-841), la cual adopta la conformación 3' endo posicionando el átomo de flúor electronegativo en la posición axial. Otras modificaciones del anillo ribosa, por ejemplo la sustitución en la posición 4' para dar nucleósidos modificados 4'-F (Guillerm et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (1995), 5, 1455-1460 y Owen et al., J. Org. Chem. (1976), 41, 3010-3017), o por ejemplo la modificación para producir análogos de metanocarbanonucleósidos (Jacobson et al., J. Med. Chem. Lett. (2000), 43, 2196-2203 y Lee et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (2001), 11, 1333-1337) inducen también la preferencia por la conformación 3' endo. A lo largo de líneas similares, los disparadores oligoméricos de la respuesta de iARN pueden estar compuestos de uno o más mononucleósidos modificados de una manera tal que la conformación se asegura en una conformación tipo C3' endo, esto es ácido nucleico asegurado, (LNA, Singh et al, Chem. Commun. (1998), 4, 455-456), y ácidos nucleicos con puentes de etileno (ENA, Morita et al, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2002), 12, 73-76.). Ejemplos de nucleósidos modificados compatibles con la presente invención se muestran más adelante en la Tabla I. estos ejemplos se entienden como representativos y no exhaustivos.

Tabla 1





La conformación preferida de nucleósidos modificados y sus oligómeros puede ser estimada mediante diversos métodos tales como cálculos de dinámica molecular, espectroscopía de resonancia magnética nuclear y mediciones CD. Por lo tanto, las modificaciones predichas para introducir conformaciones similares en ARN, una geometría dúplex de forma A en un contexto oligomérico, se seleccionan para uso en los oligonucleótidos modificados de la presente invención. Las síntesis de numerosos de los nucleósidos modificados apropiados para la presente invención son conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Chemistry of Nucleosides and Nucleotides Vol. 1 – 3, ed. Leroy B. Townsend, 1998, Plenum press., y los ejemplos de la sección a continuación). Los nucleósidos conocidos por ser inhibidores/sustratos para polimerasas de ARN dependientes de ARN (por ejemplo HCV NS5B

En un aspecto, la presente invención está dirigida a oligonucleótidos que se preparan copropiedades potenciadas en comparación con el ARN nativo contra objetivos de ácidos nucleicos. Un objetivo es identificado y un oligonucleótido es seleccionado de forma que tenga una longitud y una secuencia efectiva que sea complementaria a una porción de la secuencia objetivo. Cada nucleósido de la secuencia es sometido a escrutinio para posibles modificaciones de potenciamiento. Una modificación preferida sería el reemplazo de uno o más nucleósidos de ARN con nucleósidos que tengan la misma geometría conformacional 3' endo. Tales modificaciones pueden potenciar la estabilidad química y de la nucleasa con respecto al ARN nativo mientras que al mismo tiempo es mucho más barato y fácil de sintetizar y/o incorporarlo en un oligonucleótido. La secuencia seleccionada puede ser dividida adicionalmente en regiones y los nucleósidos de cada región evaluados para potenciar las modificaciones que puedan ser el resultado de una configuración quimérica. También se da consideración a los terminales 5 y 3' puesto que hay modificaciones frecuentemente ventajosas que pueden hacerse a uno o más de los nucleósidos terminales. Los compuestos oligoméricos de la presente invención pueden incluir al menos un grupo fosfato modificado 5' sobre una cadena sencilla o sobre al menos una posición 5' de una secuencia o secuencias de cadena doble. Modificaciones adicionales también son consideradas tales como los enlaces internucleósido, grupos conjugados, azúcares o bases sustitutos, sustitución de uno o más nucleósidos con imitadores de nucleósidos y cualquier otra modificación que pueda potenciar la secuencia seleccionada para su objetivo previsto. Los términos utilizados para describir la geometría conformacional de los ácidos nucleicos homodúplex son "Forma A" para ARN y "Forma B" para ADN. La geometría conformacional respectiva para los dúplex ARN y ADN fue determinada por análisis por difracción de rayos X de fibras de ácidos nucleicos (Arnott and Hukins, Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 47, 1504). En general, los dúplex ARN:ARN son más estables y tienen temperaturas de fusión más altas (T_m) que los dúplex ADN:ADN (Sanger et al., Principles of Nucleic Acid Structure, 1984, Springer-Verlag; New York, NY.; Lesnik et al., Biochemistry, 1995, 34, 10807-10815; Conte et al., Nucleic Acids Res., 1997, 25, 2627-634). La estabilidad incrementada del ARN ha sido atribuida a varias características estructurales, la más notable las interacciones mejoradas de apilamiento de bases que son el resultado de una geometría de forma A (Searle et al., Nucleic Acids Res., 1993, 21, 2051-2056). La presencia del 2' hidroxilo en ARN desplaza el azúcar hacia un plegador C3' endo, esto es, también designado como plegador Northern, lo que hace que el dúplex favorezca la geometría de forma A. Además, los grupos 2' hidroxilo del ARN pueden formar una red de enlaces de hidrógeno mediados por agua que ayudan a estabilizar el dúplex ARN (Egli et al., Biochemistry, 1996, 35, 8489-8494). Por otro lado, los ácidos desoxinucleicos prefieren un plegador de azúcar C2' endo, también conocido como plegador Southern, del cual se cree que imparte una geometría de forma B menos estable. (Sanger, W. (1984) Principles of Nucleic Acid Structure,

Springer-Verlag, New York, NY). Tal como se utiliza aquí, la geometría de forma B es inclusiva tanto de plegador C2' endo como O4' endo. Esto es consistente con Berger, et. al., *Nucleic Acids Research*, 1998, 26, 2473-2480, quienes señalaron que en consideración de las conformaciones de furanosa que dan lugar a los dúplex forma B también debe considerarse otorgar al plegador O4' endo una contribución.

- 5 Los dúplex híbridos ADN:ARN, sin embargo son menos estables que los dúplex ARN:ARN puros, y dependiendo de su secuencia pueden ser más o menos estables que los dúplex ADN:ADN (Searle et al., *Nucleic Acids Res.*, 1993, 21, 2051-2056). La estructura de un dúplex híbrido es un intermedio entre las geometrías forma A y B, las cuales pueden dar como resultado interacciones de pobre apilamiento (Lane et al., *Eur. J. Biochem.*, 1993, 215, 297-306; Fedoroff et al., *J. Mol. Biol.*, 1993, 233, 509-523; Gonzalez et al., *Biochemistry*, 1995, 34, 4969-4982; Horton et al., *J. Mol. Biol.*, 1996, 264, 521-533). La estabilidad del dúplex formado entre un ARN objetivo y una secuencia sintética es definitivo para terapias tales como pero no limitándose a antisentido e interferencia de ARN puesto que estos mecanismos requieren el enlazamiento de una cadena de oligonucleótido sintética a una cadena objetivo de ARN.

- 10 En el caso del antisentido, la inhibición efectiva del ARNm requiere que el ADN antisentido tenga una afinidad de enlazamiento muy alta con el ARNm. De otra forma la interacción deseada entre la cadena de oligonucleótidos sintética y la cadena de ARNm objetivo ocurrirá de manera poco frecuente, dando como resultado una eficacia disminuida.

- 15 Un método utilizado rutinariamente para modificar el plegamiento del azúcar es la sustitución del azúcar en la posición 2' con un grupo sustituyente que influye en la geometría del azúcar. La influencia sobre la conformación del anillo depende de la naturaleza del sustituyente en la posición 2'. Se ha estudiado un cierto número de sustituyentes diferentes para determinar su efecto de plegamiento en el azúcar. Por ejemplo, se han estudiado 2'-halógenos lo que muestra que el derivado 2'-flúor exhibe la población más grande (65%) de la forma C3'-endo, y el 2'-yodo exhibe la población más baja (7%). Las poblaciones de adenosina (2'-OH) versus desoxiadenosina (2'-H) son 36% y 19%, respectivamente. Además, el efecto del grupo 2'-flúor de los dímeros de adenosina (2'-desoxi-2'-fluoroadenosina – 2'-desoxi-2'-fluoro-adenosina) está correlacionado adicionalmente con la estabilización de la conformación apilada.

- 20 Como se esperaba, la estabilidad del dúplex relativa puede ser potenciada por reemplazo de los grupos 2'-OH con grupos 2'-F incrementado por lo tanto la población de C3'-endo. Se asume que la naturaleza altamente polar del enlace 2'-F y la extrema preferencia por el plegamiento C3'-endo puede estabilizar la conformación apilada en un dúplex de forma A. Los datos de hipocromicidad en UV, dicroísmo circular y ¹H RMN también indican que el grado de apilamiento disminuye a medida que la electronegatividad del sustituyente A lo disminuye. Adicionalmente, el volumen estérico con la posición 2' de la unidad estructural azúcar se acomoda mejor en un dúplex forma A que en un dúplex forma B. Así, se cree que un sustituyente 2' sobre el terminal 3' de un monofosfato de dinucleósido ejerce un cierto número de efectos sobre la conformación de apilamiento: repulsión estérica, preferencia por plegamiento de furanosa, repulsión electrostática, atracción hidrofóbica y capacidades de enlazamiento de hidrógeno. Se cree que estos efectos sustituyente son determinados por el tamaño molecular, electronegatividad, e hidrofobicidad del sustituyente. Las temperaturas de fusión de las cadenas complementarias también se incrementan con los difosfatos de adenosina sustituidos en 2'. No es claro si la preferencia por 3'-endo de la conformación o la presencia del sustituyente es responsable del enlazamiento incrementado. Sin embargo, puede alcanzarse una superposición mayor de bases adyacentes (apilamiento) con la conformación 3'-endo.

- 30 Una modificación en 2' sintética que imparte una resistencia incrementada a la nucleasa y una afinidad de enlazamiento muy alta a los nucleótidos es la cadena lateral 2-metoxietoxi (2'-MOE, 2'-OCH₂CH₂OCH₃) y (Baker et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 11944-12000). Una de las ventajas intermedias de la sustitución 2'-MOE es el mejoramiento en la afinidad de enlazamiento, la cual es mayor que muchas modificaciones 2' similares tales como O-metilo, O-propilo, y O-aminopropilo. Los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-O-metoxietilo también han demostrado ser inhibidores antisentido de la expresión genética con características prometedoras en el uso *in vivo* (Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann et al., *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637; y Altmann et al., *Nucleosides Nucleótidos*, 1997, 16, 917-926). Con respecto al ADN, los oligonucleótidos que tienen la modificación 2'-MOE desplegaron una afinidad mejorada por ARN y mayor resistencia a la nucleasa. Los oligonucleótidos quiméricos que tienen sustituyentes 2'-MOE en los nucleósidos del ala y una región interna de nucleótidos desoxi-fosforotioato (también denominada un oligonucleótido con brecha u oligómero con brecha) han mostrado una reducción efectiva en el crecimiento de tumores en modelos animales a dosis bajas. Los oligonucleótidos sustituidos con 2'-MOE también han mostrado una promesa sobresaliente como agentes antisentido en diferentes estados de la enfermedad. Uno de tales oligonucleótidos sustituidos con MOE está siendo investigado actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de retinitis CMV.

Químicas definidas

- 55 A menos que se defina otra cosa aquí, alquilo significa un hidrocarbilo alifático de cadena recta o (cuando sea posible) ramificada C₁-C₁₂, preferiblemente C₁-C₈, y más preferiblemente C₁-C₆.

Al menos que se defina otra cosa aquí, heteroalquilo significa una cadena hidrocarbilo alifática recta o (cuando sea posible) ramificada C₁-C₁₂, preferiblemente C₁-C₈ y más preferiblemente C₁-C₆ que contiene al menos uno, y preferiblemente al menos 1 a aproximadamente 3, heteroátomos en la cadena, incluyendo la porción terminal de la

cadena. Heteroátomos preferidos incluyen N, O y S. Al menos que se defina aquí otra cosa, cicloalquilo significa un anillo hidrocarbilo alifático C₃-C₁₂, preferiblemente C₃-C₈, y más preferiblemente C₃-C₆.

Al menos que se defina otra cosa aquí, alqueno significa alqueno C₂-C₁₂, preferiblemente C₂-C₈ y más preferiblemente C₂-C₆, el cual puede ser una unidad estructural hidrocarbilo recta o (cuando sea posible) ramificada, la cual contiene al menos un doble enlace carbono-carbono.

Al menos que se defina otra cosa aquí, alquino significa alquino C₂-C₁₂, preferiblemente C₂-C₈, y más preferiblemente C₂-C₆, el cual puede ser una unidad estructural hidrocarbilo recta o (cuando sea posible) ramificada, la cual contiene al menos un triple enlace carbono-carbono.

Al menos que se defina otra cosa aquí, heterocicloalquilo significa una unidad estructural de anillo que contiene al menos 3 miembros de anillo, al menos uno de los cuales es carbono, y de los cuales 1, 2 o 3 miembros de anillo son diferentes a carbono. Preferiblemente el número de átomos de carbono varía de 1 a aproximadamente 12, preferiblemente de 1 a aproximadamente 6, y un número total de miembros de anillo varían desde 3 hasta aproximadamente 15, preferiblemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8. Heteroátomos de anillo preferidos son N, O y S. grupos heterocicloalquilo preferidos incluyen morfolino, tiomorfolino, piperidinilo, piperazinilo, homopiperidinilo, homopiperazinilo, homomorfolino, homotiomorfolino, pirrolodinilo, tetrahidrooxazolilo, tetrahidroimidazolilo, tetrahidrotiazolilo, tetrahidroisoxazolilo, tetrahidropirrazolilo, furanilo, piranilo, y tetrahidroisotiazolilo.

Al menos que se defina aquí otra cosa, arilo significa una estructura de anillo hidrocarburo que contiene al menos un anillo arilo. Anillos arilo preferido tienen aproximadamente 6 hasta aproximadamente 20 carbonos de anillo. Anillos arilo especialmente preferidos incluyen fenilo, naftilo, antraceno y fenantreno.

Al menos que se defina aquí otra cosa, hetarilo significa una unidad estructural que contiene al menos un anillo completamente insaturado, consistiendo el anillo de átomos de carbono y no carbono. Preferiblemente el sistema de anillo contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 anillos. Preferiblemente el número de átomos de carbono varía desde 1 hasta aproximadamente 12, preferiblemente de 1 hasta aproximadamente 6, y el número total de miembros de anillo varía desde 3 hasta aproximadamente 15, preferiblemente desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 8. Heteroátomos de anillo preferido son N, O y S. Unidades estructurales hetarilo preferidas incluyen pirazolilo, tiofenilo, piridilo, imidazolilo, tetrazolilo, piridilo, pirimidinilo, purinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, bencimidazolilo, benzotiofenilo, etc.

Al menos que se defina otra cosa aquí, cuando una unidad estructural es definida como una unidad estructural de compuesto, tal como hetarilalquilo (hetarilo y alquilo), aralquilo (arilo y alquilo), etc., cada una de las subunidades estructurales es como se define aquí.

Al menos que se defina aquí otra cosa, un grupo extractor de electrones es un grupo, tal como el grupo ciano o isocianato que extrae carga electrónica del carbono al cual está enlazado. Otros grupos extractores de electrones de nota incluyen aquellos cuyas electronegatividad exceden la del carbono, por ejemplo halógeno, nitro o fenilos sustituidos en la posiciones orto o para con uno o más grupos ciano, isotiocianato, nitro o halo.

Al menos que se defina otra cosa aquí, los términos halógeno y halo tienen sus significados ordinarios. Sustituyentes halo (halógeno) preferidos son Cl, Br, e I.

Los sustituyentes opcionales antes mencionados son, al menos que se defina aquí otra cosa, sustituyentes adecuados dependiendo de las propiedades deseadas. Se incluyen halógenos (Cl, Br, I), unidades estructurales alquilo, alqueno y alquino, NO₂, NH₃ (sustituido y no sustituidos), unidades estructurales ácido (por ejemplo -CO₂H, -OSO₃H₂, etc.), unidades estructurales heterocicloalquilo, unidades estructurales hetarilo, unidades estructurales arilo, etc. En todas las formas precedentes, la virgüilla (~) indica un enlace a un oxígeno o azufre del 5'- fosfato.

Grupos protectores fosfato incluyen los descritos en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,760,209, US 5,614,621, US 6,051,699, US 6,020,475, US 6,326,478, US 6,169,177, US 6,121,437, US 6,465,628.

Los oligonucleótidos usados de acuerdo con esta invención pueden de manera conveniente y rutinaria hacerse a través de una técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Equipos para tales síntesis son vendidos por varios proveedores incluyendo a Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para tal síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos está bien encajada dentro de los talentos rutinarios. Es bien conocido utilizar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y los derivados 2'- alcoxi o 2'- alcoxialcoxi, incluyendo oligonucleótidos 2'- O-metoxietilo (Martin, P., Helv. Chim. Acta 1995, 78, 486-504). También es conocido utilizar técnicas similares y amiditas modificadas disponibles comercialmente y productos en vidrio de poro controlado (CPG) tales como biotina, fluoresceína, acridina o amiditas modificadas con psoraleno y/ CPG (disponible de Glen Research, Sterling, VA) para sintetizar oligonucleótidos marcados por fluorescencia, biotinilados u otros conjugados.

Composiciones y formulaciones antisentido

Los compuestos de la invención también pueden ser mezclados, encapsulados, conjugados y de alguna otra manera asociados con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo liposomas, moléculas direccionadas al receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para asistir en la ingesta, distribución y/o absorción. Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales formulaciones de ayuda para la ingesta, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, US: 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; y 5,595,756.

10 Los compuestos antisentido de la invención abarcan cualquier sal, éster o sales de tales ésteres, farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto, el cual por administración a un animal que incluye un humano, es capaz de proveer (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo. De acuerdo con lo anterior, por ejemplo, la divulgación también está dirigida a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, sales farmacéuticamente aceptables de tales profármacos, y otros bioequivalentes.

15 El término "profármaco" indica un agente terapéutico que es preparado en una forma inactiva que es convertida a una forma activa (por ejemplo, fármaco) dentro del cuerpo o células del mismo mediante la acción de enzimas endógenas u otros agentes químicos y/o condiciones. En particular, las versiones profármaco de los oligonucleótidos de la invención se preparan como derivados SATE (S-acetil-2-tioetil) de acuerdo con los métodos divulgados en WO 93/24510 de Gosselin et al., publicada el 9 de diciembre de 1993 o en WO 94/26764 y U. S. 5,770,713 de Imbach et al.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: esto es, sales que retengan la actividad biológica deseada del compuesto original y no impartan efectos toxicológicos indeseados al mismo.

25 Sales de adición básica farmacéuticamente aceptables se forma con metales o aminas, tales como metales alcalino y alcalinotérreos o amidas orgánicas. Ejemplos de metales utilizados como cationes son sodio, potasio, magnesio, calcio y similares. Ejemplos de aminas adecuadas son N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, dicicloexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína (véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts", J. of Pharma Sci., 1977, 66, 1-19). Tal como se utiliza aquí, una "sal de adición farmacéutica" incluye una sal farmacéuticamente aceptable de una forma ácida de uno de los componentes de las composiciones de la invención. Estas incluyen sales de ácidos orgánicos o inorgánicos de las aminas. Sales ácidas preferidas son los clorhidratos, acetatos, salicilatos, nitratos y fosfatos. Otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas son bien conocidas para los experimentados en el arte e incluyen sales básicas de una variedad de ácidos inorgánicos y orgánicos.

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

Composiciones farmacéuticas y rutas de administración

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas en un cierto número de maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas incluyendo administración vaginal y rectal), pulmonar, por ejemplo por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo el uso de nebulizado; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intraventricular. Oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo se cree que son útiles particularmente para administración oral.

55 Composiciones y formulaciones farmacéuticas para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aspersiones, líquidos y polvos. Vehículos farmacéuticos convencionales, acuosos, en polvo o bases oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. Condones recubiertos, guantes y similares también pueden ser útiles. Formulaciones tópicas preferidas incluyen aquellas en las cuales los oligonucleótidos de la invención y en mezcla con un agente de administración tópico tales como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y surfactantes. Lípidos y liposomas preferidos incluyen neutros (por ejemplo dioleilfosfatidilo DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidilo

colina DMPC, diestearoilfosfatidilo colina), negativos, (por ejemplo dimiristoilfosfatidilo glicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidilo etanolamina (DOTMA). Los oligonucleótidos de la invención pueden ser encapsulados con liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los oligonucleótidos pueden ser complejados en lípidos, en particular con

- 5 lípidos catiónicos. Ácidos grasos y ésteres preferidos incluyen pero no se limitan a ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, glicerilo 1-monocaprato, 1-dodecilo aciloleptano-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina del éster de alquilo C₁-C₁₀ (por ejemplo isopropilmiristato IPM), monoglicéridos, diglicéridos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 10 En algunas realizaciones, un oligonucleótido puede ser administrado a un sujeto a través de una ruta oral de administración. Los sujetos de la presente invención comprenden animales. Un animal sujeto puede ser un mamífero, tal como un ratón, una rata, un perro, una cobaya, un mono, un humano, un primate no humano, un gato o un perro. Primates no humanos incluyen monos y chimpancés. Un animal sujeto adecuado puede ser un animal experimental, tal como un ratón, una rata, un perro, un primate no humano, un gato o un cerdo.
- 15 En algunas realizaciones el sujeto puede ser un humano. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente humano tal como se discute en más detalle aquí. En ciertas realizaciones, puede ser necesario modular la expresión de uno o más genes del paciente humano. En algunas realizaciones particulares, puede ser necesario inhibir la expresión de uno o más genes de paciente humano. En realizaciones particulares, puede ser necesario modular, esto es, inhibir o potenciar, la STAT3 con el fin de obtener resultados terapéuticos discutidos aquí.
- 20 En algunas realizaciones, formulaciones no parenterales (por ejemplo orales) de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención dan como resultado una biodisponibilidad potenciada del oligonucleótido. En este contexto, el término "biodisponibilidad" se refiere a una medición de aquella porción de un fármaco administrado que alcanza el sistema circulatorio (por ejemplo sangre, especialmente plasma sanguíneo) cuando se usa un modo particular de
- 25 administración para suministrar el fármaco. La biodisponibilidad potenciada se refiere a un modo particular de habilidad de administración para suministrar oligonucleótido al plasma sanguíneo periférico de un sujeto con respecto a otro modo de administración. Por ejemplo, cuando se usa un modo no parenteral de administración (por ejemplo un modo oral) para introducir el fármaco en un sujeto, la biodisponibilidad para ese modo de administración puede ser comparada con un modo diferente de administración, por ejemplo, un modo IV de administración. En algunas realizaciones, el área bajo una curva de concentración del compuesto en plasma sanguíneo (AUC₀) después de una administración no parenteral puede ser dividida por el área bajo la curva de concentración del fármaco en plasma sanguíneo después de la administración intravenosa (i.v.) (AUC_{IV}) para proveer un cociente
- 30 adimensional (biodisponibilidad relativa, RB) que representa la fracción de compuesto absorbida a través de la ruta no parenteral en comparación con la ruta IV. Se dice que la biodisponibilidad de una composición es potenciada en comparación con otra biodisponibilidad de la composición cuando la primera biodisponibilidad relativa de la composición (RB₁) es mayor que la segunda biodisponibilidad relativa de la composición (RB₂).
- 35

En general, la biodisponibilidad se correlaciona con la eficacia terapéutica cuando la eficacia terapéutica de un compuesto está relacionada con la concentración en sangre alcanzada, incluso si el sitio final de acción del fármaco es intracelular (van Berge-Henegowen et al., Gastroenterol., 1977, 73,300). Se han usado estudios de biodisponibilidad para determinar el grado de absorción intestinal de un fármaco midiendo el cambio en los niveles

- 40 en sangre periférica del fármaco después de una dosis oral (DiSanto, Chapter 76 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, páginas 1451-1458).

En general, la biodisponibilidad de una composición oral (que comprende un oligonucleótido) se dice que está "potenciada" cuando su biodisponibilidad relativa es mayor que la biodisponibilidad de una composición que consiste sustancialmente de oligonucleótido puro, esto es, oligonucleótido en la ausencia de un potenciador de la

- 45 penetración.

La biodisponibilidad en órganos se refiere a la concentración del compuesto en un órgano. La biodisponibilidad en órganos puede medirse en sujetos de prueba por un cierto número de medios, tales, como radiografía de cuerpo completo. La biodisponibilidad en órganos puede ser modificada, por ejemplo, potenciada, por una o más modificaciones al oligonucleótido, mediante el uso de uno o más compuestos portadores o excipientes, etc., tal como se discute en más detalle aquí. En general, un incremento en la biodisponibilidad dará como resultado un incremento en la biodisponibilidad en los órganos.

- 50

Las composiciones de oligonucleótidos orales de acuerdo con la presente invención pueden comprender uno o más "potenciadores de la penetración por mucosas", también conocidos como "potenciadores de la absorción" o simplemente como "potenciadores de la penetración". De acuerdo con lo anterior, algunas realizaciones de la invención comprenden al menos un oligonucleótido en combinación con al menos un potenciador de la penetración. En general, un potenciador de la penetración es una sustancia que facilita el transporte de un fármaco a través de las membranas mucosas asociadas con el modo deseado de administración, por ejemplo, en membranas epiteliales intestinales. De acuerdo con lo anterior es deseable seleccionar uno o más potenciadores de la penetración que faciliten el consumo de un oligonucleótido, sin interferir con la actividad del oligonucleótido, y de tal forma el

- 55

oligonucleótido puede ser introducido en el cuerpo de un animal sin un grado inaceptable de efectos colaterales tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica.

Realizaciones de la presente invención proveen composiciones que comprenden uno o más potenciadores de la penetración farmacéuticamente aceptables, y métodos para utilizar tales composiciones, lo cual da como resultado la biodisponibilidad mejorada de oligonucleótidos administrados a través de modos no parenterales de administración. Hasta ahora, se han usado cierto potenciadores de la penetración para mejorar la biodisponibilidad de ciertos fármacos. Véase Muranishi, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1 y Lee et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Systems, 1991, 8, 91. Se ha encontrado que el consumo y suministro de oligonucleótidos puede mejorarse notablemente cuando se administran por medios no parenterales a través del uso de un cierto número de diferentes clases de potenciadores de la penetración.

En algunas realizaciones, las composiciones para administración no parenteral incluyen una o más modificaciones para oligonucleótidos de origen natural (esto es, desoxirribosilfosfodiéster completo o ribosilfosfodiéster-completo oligonucleótidos). Tales modificaciones pueden incrementar la afinidad de enlazamiento, la estabilidad a la nucleasa, la permeabilidad de las células o tejidos, la distribución en tejidos u otras propiedades biológicas o farmacocinéticas. Pueden hacerse modificaciones a la base, al enlazante, o al azúcar, en general, tal como se discute en más detalle aquí con respecto a la química de oligonucleótidos. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones para administración a un sujeto, y en particular las composiciones orales para administración a un sujeto animal (humano o no humano), comprenderán oligonucleótidos modificados que tienen una o más modificaciones para potenciar la afinidad, estabilidad, distribución en tejido u otra propiedad biológica.

Enlazantes modificados adecuados incluyen enlazantes de fosforotioato. En algunas realizaciones de acuerdo con la invención, el oligonucleótido tiene al menos un enlazante fosforotioato. Los enlazantes de fosforotioato proveen estabilidad a la nucleasa así como características de enlazamiento de la proteína del plasma al oligonucleótido. La estabilidad a la nucleasa es útil para incrementar el tiempo de vida *in vivo* de los oligonucleótidos, mientras que el enlazamiento a la proteína del plasma disminuye la rata de primer despeje de paso del oligonucleótido a través de la excreción renal. En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos dos enlazantes de fosforotioato. En algunas realizaciones, cuando el oligonucleótido tiene exactamente n nucleósidos, el oligonucleótido tiene de 1 a $n-1$ enlaces fosforotioato. En algunas realizaciones, cuando el oligonucleótido tiene exactamente n nucleósidos, el oligonucleótido tiene $n-1$ enlaces fosforotioato. En otras realizaciones en donde el oligonucleótido tiene exactamente n nucleósidos, y n es par, el oligonucleótido tiene de 1 a $n/2$ enlaces fosforotioato, o, cuando n es impar, de 1 a $(n-1)/2$ enlaces fosforotioato. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene enlaces fosfodiéster (PO) y fosforotioato (PS) alternantes. En otras realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos un estiramiento de dos o más enlaces PO consecutivos y al menos un estiramiento de dos o más enlaces PS. En otras realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos dos estiramientos de enlaces PO interrumpidos por al menos un enlace PS.

En algunas realizaciones, al menos uno de los nucleósidos es modificado sobre la unidad de azúcar ribosilo mediante una modificación que imparte estabilidad ante la nucleasa, afinidad de enlazamiento o alguna otra propiedad biológica beneficiosa para el azúcar. En algunos casos, la modificación del azúcar incluye una modificación 2', por ejemplo, el 2'-OH del azúcar ribosilo es reemplazado o sustituido. Reemplazos adecuados para 2'-OH incluyen 2'-F y 2'-arabino-F. Sustituciones adecuadas para OH incluyen 2'-O-alquilo, por ejemplo 2'-O-metilo, y 2'-O-alquilo sustituido, por ejemplo 2'-O-metoxietilo, 2'-NH₂, 2'-O-aminopropilo, etc. En algunas realizaciones, el oligonucleótido contiene al menos una modificación 2'. En algunas realizaciones, el oligonucleótido contiene al menos dos modificaciones 2'. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos una modificación 2' en cada uno de los terminales (esto es, los nucleósidos en el terminal 3' y 5' tienen cada uno la misma o diferente modificación 2'). En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos dos modificaciones 2' secuenciales en cada extremo del oligonucleótido. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos comprenden adicionalmente al menos un desoxinucleósido. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos comprenden un estiramiento de desoxinucleósidos de tal forma que el estiramiento es capaz de reactivar la RNasa (por ejemplo RNasa H) por escisión de una RNA a cual el oligonucleótido es capaz de hibridar. En algunas realizaciones, un estiramiento de desoxinucleótido es capaz de activar la escisión de RNA mediada por RNasa comprende aproximadamente 6 hasta aproximadamente 16, por ejemplo de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 16 desoxinucleósidos consecutivos. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos son capaces de disparar la escisión por enzimas seARNds las cuales actúan sobre los híbridos ARN:ARN.

Las composiciones de oligonucleótidos de la presente invención pueden ser formuladas en diversas formas de dosificación tales como, pero no limitándose a, tabletas, cápsulas, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. El término "administración alimentaria" abarca, por ejemplo, administración oral, rectal, endoscópica y sublingual/bucal. Un requerimiento común para estos modos de administración es la absorción a lo largo de una porción o en todo el tracto alimenticio y una necesidad para una penetración eficiente por las mucosas de los oligonucleótidos o imitadores de los mismos así administrados.

La administración de un fármaco a través de la mucosa oral, como en el caso de la administración bucal sublingual, tiene varias características deseables, incluyendo como en muchos casos, una elevación más rápida en la

concentración en plasma del fármaco (Harvey, Chapter 35 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, page 711).

Puede utilizarse endoscopia para administrar un fármaco directamente en una porción interior del tracto alimenticio. Por ejemplo, la cistopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP) aprovecha la gastroscopia extendida y permite un acceso selectivo al tracto biliar y al ducto pancreático (Hirahata et al., Gan To Kagaku Ryoho, 1992, 19(10 Suppl.), 1591). Las composiciones farmacéuticas, incluyendo formulaciones liposómicas, pueden ser administradas directamente en porciones del canal alimenticio, tal como, por ejemplo, el duodeno (Somogyi et al., Pharm. Res., 1995, 12, 149) o la submucosa gástrica (Akamo et al., Japanese J. Cancer Res., 1994, 85, 652) a través de medios endoscópicos. Los dispositivos de lavado gástrico (Inoue et al., Artif. Organs, 1997, 21, 28) y los dispositivos de alimentación endoscópica percutánea (Pennington et al., Ailment Pharmacol. Ther., 1995, 9, 471) también pueden ser utilizados para una administración alimentaria directa de composiciones farmacéuticas.

En algunas realizaciones, pueden administrarse formulaciones de oligonucleótidos a través del ano en el recto o en el intestino inferior. Los supositorios rectales, enemas de retención o catéteres rectales pueden ser utilizados para este propósito y pueden ser preferidos cuando el cubrimiento del paciente puede de alguna otra manera ser difícil de alcanzar (por ejemplo, en aplicaciones pediátricas y geriátricas, o cuando el paciente está vomitando o inconsciente. La administración rectal puede dar como resultado niveles más rápidos y más altos en sangre que la ruta oral (Harvey, Chapter 35 In: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, page 711). Puesto que aproximadamente el 50% del fármaco es absorbido a través del recto probablemente evitará el hígado, la administración por esta ruta reduce significativamente el potencial del metabolismo de primer paso (Benet et al., Chapter 1 In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al., eds., McGraw-Hill, New York, NY, 1996).

Otros excipientes que pueden ser agregados a las composiciones de oligonucleótidos orales incluyen surfactantes (o "agentes con actividad superficial"). Estas son entidades químicas las cuales, cuando se disuelven en una solución acuosa, reducen la tensión superficial sobre la solución o la tensión interfases entre la solución acuosa y otro líquido, con el resultado de que la absorción de los oligonucleótidos a través de la mucosa alimentaria y otras membranas epiteliales es potenciada. Además de las sales biliares y ácidos grasos, los surfactantes incluyen, por ejemplo, laurilo sulfato de sodio, polioxietilen-9-laurilo éter y polioxietilen-20-cetilo éter (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92); y emulsiones perfluorohémicas, tales como FC-43 (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Los ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración y pueden ser utilizados en composiciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monoolein (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilasaciloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas y mono y di-glicéridos de los mismo y/o sales fisiológicamente aceptables de los mismos (esto es, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1; El-Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651).

En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos para administración oral comprenden al menos dos fases discretas, fases que pueden comprender partículas, cápsulas, cápsulas de gel, microesferas, etc. Cada fase puede contener uno o más oligonucleótidos, potenciadores de la penetración, surfactantes, bioadhesivos, agentes efervescentes, u otros adyuvantes, excipientes o diluyentes. En algunas realizaciones, una fase comprende al menos un oligonucleótido y al menos un potenciador de la penetración. En algunas realizaciones, una primera fase comprende al menos un oligonucleótido y al menos un potenciador de la penetración, mientras que una segunda fase comprende al menos un potenciador de la penetración. En algunas realizaciones, una primera fase comprende al menos un oligonucleótido y al menos un potenciador de la penetración mientras que una segunda fase comprende al menos un potenciador de la penetración y sustancialmente ningún oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos una fase está compuesta con al menos un retardante de la degradación tal como un recubrimiento o una matriz, el cual retrasa la liberación del contenido de esa fase. En algunas realizaciones, al menos una fase, en algunas realizaciones, una primera fase comprende al menos un oligonucleótido, al menos un potenciador de la penetración, mientras que una segunda fase comprende al menos un potenciador de la penetración y un retardante de la liberación. En realizaciones particulares, una composición de oligonucleótido oral comprende una primera fase que comprende partículas que contienen un oligonucleótido y un potenciador de la penetración, y una segunda fase que comprende partículas recubiertas con un agente retardador de la liberación y que contiene un potenciador de la penetración.

Una variedad de sales biliares también funciona como potenciador de la penetración para facilitar el consumo y biodisponibilidad de fármacos. Los papeles fisiológicos de la bilis incluyen la facilitación de la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasas (Brunton, Chapter 38 In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al., eds., McGraw-Hill, New York, NY, 1996, páginas 934-935). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de la penetración. Así, el término "sal biliar" incluye cualquiera de los componentes de origen natural de la bilis así como de cualquiera de sus derivados

sintéticos. Las sales biliares de la invención incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o su sal de sodio farmacéuticamente aceptable, colato de sodio), ácido deshídrocólico (deshídrocolato de sodio), ácido desoxicolico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicolato de sodio), ácido glicodesoxicolico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicolico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicolico (CDCA, quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicolico (UDCA), tauro -24,25-dihidro-fusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y polioxietilen-9-laurilo éter (POE) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579).

En algunas realizaciones, los potenciadores de penetración de la presente invención son mezclas de compuestos potenciadores de la penetración. Una tal mezcla de penetración es UDCA (y/o CDCA) con ácidos cáprico y/o láurico o sales de los mismos, por ejemplo de sodio. Tales mezclas son útiles para potenciar la administración de sustancias biológicamente activas a través de membranas mucosas. En particular de la mucosa intestinal. Otras mezclas potenciadoras de la penetración comprenden aproximadamente 5 - 95% de ácidos biliares o sales UDCA y/o CDCA con 5 - 95% de ácido cáprico y/o láurico. Los potenciadores particulares de la penetración son mezclas de las sales de sodio de UDCA, ácido cáprico y ácido láurico en una relación de aproximadamente 1:2:2 respectivamente. Otro tal potenciador de la penetración es una mezcla de ácido cáprico y láurico (o sales de los mismos) en una relación 0.01:1 a 1:0.01 (en base molar). En realizaciones particulares el ácido cáprico y el ácido láurico están presentes en relaciones molares de por ejemplo aproximadamente 0.1:1 a aproximadamente 1:0.1, en particular de aproximadamente 0.5:1 a aproximadamente 1:0.5.

Otros excipientes incluyen agentes quelantes, esto es compuestos que remueven los iones metálicos de la solución formando complejos con los mismos, con el resultado de que la absorción de los oligonucleótidos a través de la mucosa alimentaria y otras es potenciada. Con respecto a su uso como potenciadores de la penetración en composiciones que contienen oligonucleótidos similares a ADN en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja agregada de servir también como inhibidores de la ADNasa, puesto que las nucleasas de ADN más caracterizadas requieren un ión metálico divalente para la catálisis y son por lo tanto inhibidas por agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315). Los agentes quelantes de la invención incluyen, pero no se limitan a, etilen diamino tetraacetato de bisodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados N-acilo de colágeno, derivados lauret-9 y N-amino acilo de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43).

Tal como se utilizan aquí, los potenciadores de la penetración no quelantes no surfactantes pueden ser definidos como compuestos que demuestran una actividad insignificante como agentes quelantes o como surfactantes pero que no obstante potencian la absorción de oligonucleótidos a través de las membranas mucosas alimentarias y otras (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1). Esta clase de potenciadores de la penetración incluye, pero no se limita a, ureas cíclicas saturadas, derivados 1-alquilo y 1-alquenilazacilo-alcanona (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes antiinflamatorios no esteroidales como diclofenaco sodio, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621).

Los agentes que potencian el consumo de oligonucleótidos a nivel celular también pueden ser agregados a las composiciones farmacéuticas, terapéuticas y otras de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser usados lípidos catiónicos, tales como LIPOFECTIN™ (Junichi et al, Patente de los Estados Unidos No. 5,705,188), derivados catiónicos de glicerol y moléculas policatiónicas, tales como polilisina (Lollo et al., solicitud PCT WO 97/30731).

Un "vehículo farmacéutico" o "excipiente" puede ser un solvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte farmacéuticamente aceptable para la administración de uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la forma planeada de administración en mente, de tal manera que provea el volumen, consistencia, etc., deseados, cuando se combina con un oligonucleótido y los otros componentes de una composición farmacéutica. Vehículos farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan, agentes enlazantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilo pirrolidona o hidroxipropilo metilcelulosa, etc.); agentes de relleno (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilo celulosa, poliácridatos o hidrógeno fosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio, talco, sílica, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilen glicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (por ejemplo almidón, glicolato de almidón de sodio, EXPLOTAB); y agentes humidificantes (por ejemplo, laurilo sulfato de sodio, etc.).

Las composiciones de oligonucleótidos orales pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos encontrados convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos por el arte. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles, farmacéuticamente activos tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o

pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas de dosificación de la composición de la presente invención, tales como colorantes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, o pacificantes, agentes espesantes y estabilizadores. Sin embargo, tales materiales, cuando se agregan no deberían interferir de manera indebida con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención.

Las composiciones o formulaciones para administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que pueden contener también reguladores, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no limitándose a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden ser generadas a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos autoemulsificantes y semisólidos autoemulsificantes.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, las cuales pueden ser presentadas convenientemente en formas de dosificación unitarias, pueden ser preparadas de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con los vehículos o excipientes farmacéuticos. En general las formulaciones son preparadas asociando uniforme e íntimamente los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario configurar el producto.

Las composiciones de la presente invención pueden ser formuladas en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero no limitándose a, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también pueden ser formuladas como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener adicionalmente sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En una realización de la presente invención, las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas y usadas como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, pero no limitándose a, emulsiones, microemulsiones, cremas, gelatinas y liposomas. Mientras que son básicamente similares en naturaleza estas formulaciones varían en los componentes y en la consistencia del producto final. La preparación de tales composiciones y formulaciones es en general conocida para los experimentados en las artes farmacéuticas y de formulación y puede ser aplicada a la formulación de las composiciones de la presente invención.

Emulsiones

Las composiciones de la presente invención pueden ser preparadas y formuladas como emulsiones. Las emulsiones son sistemas típicamente heterogéneos de un líquido dispersado en otro en la forma de gotitas que se exceden usualmente 0.1 μm de diámetro (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985, p. 301). Las emulsiones son frecuentemente sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas invisibles mezcladas íntimamente y dispersadas una con otra. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad agua en aceite (w/o) o de aceite en agua (o/w). Cuando una fase acuosa es dividida finamente en y dispersada como gotitas diminutas en una fase oleosa voluminosa la composición resultante se denomina una emulsión de agua en aceite (w/o). Alternativamente, cuando una fase oleosa es dividida finamente en y dispersada como gotitas diminutas en una fase acuosa voluminosa la composición resultante es llamada una emulsión de aceite en agua (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas y el fármaco activo el cual puede estar presente como una solución bien sea en la fase acuosa en la fase oleosa o por sí mismo en una fase separada. Los excipientes farmacéuticos tales como emulsificadores, estabilizantes, colorantes y antioxidantes también pueden estar presentes en emulsiones según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que están compuestas de más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de las emulsiones aceite en agua en aceite (o/w/o) y agua en aceite en agua (w/o/w). Tales formulaciones complejas proveen frecuentemente ciertas ventajas que las emulsiones binarias simples no proveen. Emulsiones múltiples en las cuales gotitas oleosas individuales de una emulsión o/w encierran pequeñas gotitas de agua constituyen una emulsión w/o/w. De la misma forma un sistema de gotitas oleosas encerradas en glóbulos de agua estabilizadas en una fase oleosa continua proveen una emulsión o/w/o.

Frecuentemente, la fase dispersa o discontinua de la emulsión está bien dispersa en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma a través del medio de emulsificantes o de la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión pueden ser un semisólido o un sólido, como es en el caso de ungüentos bases y cremas de tipo emulsión. Otros medios de estabilizar emulsiones conlleva el uso de emulsificantes que pueden ser

incorporados en cualquier fase de la emulsión. Los emulsificantes pueden ser clasificados ampliamente en cuatro categorías: surfactantes sintéticos, emulsificantes de origen natural, bases de absorción y sólidos finamente dispersados (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

- 5 Los surfactantes sintéticos, también conocidos como agentes activos de superficie, han encontrado amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y han sido revisados en la literatura (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Los surfactantes son típicamente anfifílicos y comprenden una porción hidrofílica y una hidrófoba.
- 10 La relación de la naturaleza hidrofílica a la hidrófoba del surfactante ha sido denominada el balance hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa en la categorización y selección de surfactantes en la preparación de formulaciones. Los surfactantes pueden ser clasificados en clases diferentes con base en la naturaleza del grupo hidrofílico: no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfotéricos (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).
- 15 Los emulsificantes de origen natural que se utilizan en formulaciones en emulsión incluyen lanolina, cera de abejas, fosfatidos, lecitina y acacia. Las bases de absorción poseen propiedades hidrofílicas de tal forma que pueden absorber agua para formar emulsiones w/o a la vez que detienen sus consistencias semisólidas, tales como lanolina anhidra y petrolato hidrofílico. Se han usado también sólidos finamente divididos como buenos emulsificadores especialmente en combinación con surfactantes y en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos
- 20 polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas no hinchables tales como bentonita, atapulgita, ectolita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de magnesio y aluminio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbono o triestearato de glicerilo.

- Una gran variedad de materiales no emulsificantes está también incluida en las formulaciones de emulsiones y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos,
- 25 ésteres grasos, humectantes, coloides hidrofílicos, conservantes y antioxidantes (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

- Coloides o hidrocoloides hidrofílicos incluyen gomas de origen natural y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, acacia, agar, ácido alginico, carragenano, goma guar, goma de karaya y tragacanto), derivados de la celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o hinchan en el agua para formar soluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando películas interfases fuertes alrededor de las gotitas de fase dispersa e incrementando la viscosidad de la fase externa.
- 30

- 35 Puesto que las emulsiones contienen frecuentemente un cierto número de ingredientes tales como carbohidratos, proteínas, esteroides y fosfatidos que pueden soportar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones incorporan frecuentemente conservantes. Conservantes comúnmente usados incluidos en las formulaciones en emulsión incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico. También se agregan con un antioxidante a las formulaciones en emulsión para evitar el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser consumidores de radicales libres
- 40 tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, o agentes reductores tales como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio y sinergistas antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

- La aplicación de formulaciones en emulsión a través de rutas dermatológicas orales y parenterales y métodos para su manufactura han sido revisadas en la literatura (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Las formulaciones en emulsión para administración oral han sido utilizadas ampliamente por razones de facilidad de formulación, eficacia desde el punto de vista de absorción y biodisponibilidad (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Laxantes en base de aceite mineral, vitaminas solubles en aceite y preparaciones nutritivas altas en grasas están dentro de los materiales que han sido administrados comúnmente por vía oral como emulsiones o/w.
- 45
- 50

- En una realización de la presente invención, la composición de oligonucleótidos se formula como microemulsiones. Una microemulsión puede ser definida como un sistema de agua, aceite y un anfifílico el cual es una solución líquida
- 55 ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Típicamente las microemulsiones son sistemas que son preparados primero por dispersión de un aceite en una solución acuosa surfactante y luego la adición de una cantidad suficiente de un cuarto componente, y en general un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también han sido descritas como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente claras de dos líquidos inmiscibles que son estabilizados
- 60

por películas interfase de moléculas con actividad superficial (Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polimers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan comúnmente a través de una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, surfactante, cosurfactante y electrolito. Si la emulsión es del tipo agua en aceite (w/o) o de aceite en agua tipo (o/w) depende de las propiedades del aceite y del surfactante usados y de la estructura y empaque geométrico de las cabezas polares y de las colas de hidrocarburo de las moléculas surfactantes (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1985, p. 271).

La aproximación fenomenológica que utiliza diagramas de fase ha sido estudiada extensamente y ha producido un conocimiento amplio, para una persona experimentada en el arte, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). En comparación con las emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los surfactantes usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, surfactantes iónicos, surfactantes no iónicos, Brij 96, éteres de polioxietileno oleilo, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequeioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solos o en combinación con cosurfactantes. El cosurfactante, usualmente un alcohol de cadena corta, tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para incrementar la fluidez interfase penetrando en la película del surfactante y consecuentemente creando una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas del surfactante. Las microemulsiones sin embargo, pueden ser preparadas sin el uso de cosurfactantes y los sistemas libres de alcohol de emulsiones autoemulsificantes son conocidos en la técnica. La fase acuosa puede ser típicamente, pero no se limita a, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poliglicérols, propileno glicoles, y derivados de etileno glicol. La fase acuosa puede incluir, pero no se limita a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y triglicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácidos grasos de glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente de interés desde el punto de vista de la solubilización de fármacos y de la absorción potenciada de los fármacos. Las microemulsiones en base lipídica (tanto o/w como w/o han sido propuestas para proteger la biodisponibilidad oral de fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas de solubilización mejorada al fármaco, protección del fármaco frente a hidrólisis enzimática con posible potenciamiento de la absorción del fármaco debido a alteraciones inducidas por el surfactante en la fluidez y permeabilidad de las membranas, facilidad de preparación, facilidad de administración oral respecto a las formas de dosificación sólida, potencia clínica mejorada, y toxicidad disminuida (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Frecuentemente las microemulsiones pueden formarse espontáneamente cuando sus componentes son reunidos a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos termolábiles, péptidos u oligonucleótidos. Las microemulsiones también han sido efectivas en la administración transdérmica de componentes activos tanto en aplicaciones cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones en microemulsión de la presente invención faciliten la absorción sistémica incrementada de oligonucleótidos desde el tracto gastrointestinal, así como mejore el consumo celular local de oligonucleótidos dentro del tracto gastrointestinal, vagina, cavidad oral y otras áreas de administración.

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

Liposomas

Hay muchas estructuras surfactantes organizadas además de las microemulsiones que han sido estudiadas utilizadas en la formulación de fármacos. Incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como los liposomas, han atraído gran interés por su especificidad y la duración de acción que ofrecen desde el punto de vista de la administración de fármacos. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilamelares u multilamelares que tiene una membrana formada a partir de un material lipofílico y un interior acuoso. La porción acuosa contiene la composición que se va a administrar. Los liposomas

catiónicos poseen la ventaja de ser capaces de fusionarse con la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no son capaces de fusionarse tan eficientemente con la pared celular, son tomados por macrófagos *in vivo*.

Con el fin de cruzar intactas la piel de los mamíferos, las vesículas lipídicas deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro menor de 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por lo tanto, es deseable usar un liposoma que sea altamente deformable capaz de pasar a través de tales poros finos.

Ventajas adicionales de los liposomas incluyen: los liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar un amplio rango de fármacos solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger fármacos encapsulados en sus compartimientos internos del metabolismo y la degradación (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga de la superficie lipídica, el tamaño de la vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

Los liposomas son útiles para la transferencia y administración de ingredientes activos en el sitio de acción. Debido a que la membrana del liposoma es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando los liposomas son aplicados a un tejido, los liposomas comienzan a fusionarse con las membranas celulares. A medida que la fusión del liposoma y la célula avanzan, el contenido del liposoma es vaciado hacia la célula en donde el agente activo puede actuar.

Las formulaciones de liposomas han sido el foco de investigaciones extensas como modo de administración de muchos fármacos. Hay una evidencia creciente de que para administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas sobre otras formulaciones. Tales ventajas incluyen efectos colaterales reducidos relacionados con una alta absorción sistémica del fármaco administrado, acumulación incrementada del fármaco administrado en el objetivo deseado, y la capacidad de administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrofílicos como hidrófobos, en la piel.

Varios reportes han detallado la capacidad de los liposomas para administrar agentes incluyendo ADN de alto peso molecular en la piel. Compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos, hormona y ADN de alto peso molecular han sido administrados a la piel. La mayoría de las aplicaciones dieron como resultado el direccionamiento de la epidermis superior.

Los liposomas caen dentro de dos clases amplias y son útiles para la administración de ADN, ARN o cualquier constructo basado en ácidos nucleicos. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que interactúan con moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. El complejo ADN/liposoma cargado positivamente se enlaza a la superficie celular cargada negativamente y es internalizado en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas son rotos, liberando su contenido en el citoplasma de la célula (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles al pH o cargados negativamente, atrapan el ADN en vez de complejarse con él. Puesto que tanto el ADN como el lípido tienen carga similar, ocurre repulsión más bien que la formación de complejo. No obstante, algo del ADN queda atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH han sido utilizados para administrar ADN que codifica el gen de timidina quinasa a monocapas celulares en cultivo. La expresión del gen exógeno fue detectada en las células objetivo (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Un tipo principal de composición liposómica incluye fosfolípidos diferentes a la fosfatidilo colina de origen natural. Las composiciones de liposomas neutras, por ejemplo, pueden formarse a partir de dimiristoilo fosfatidilo colina (DMPC) o dipalmitoilo fosfatidilo colina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicas generalmente se forman a partir de dimiristoilo fosfatidilo glicerol mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman primariamente a partir de dioleilo fosfatidilo etanolamida (DOPE). Otro tipo de composición liposómica se forma a partir de fosfatidilo colina (PC) tal como, por ejemplo, PC de soja, y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de fosfolípidos y/o fosfatidilo colina y/o colesterol.

Varios estudios han estudiado la administración tópica de formulaciones de fármacos liposómicas a la piel. La aplicación de liposomas que contienen interferón a la piel de cobayas dio como resultado una reducción en lesiones por herpes de piel mientras que la administración de interferón a través de otros medios (por ejemplo, como una solución o como una emulsión) no fue efectiva (Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Adicionalmente, un estudio adicional probó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación liposómica en comparación con la administración de interferón utilizando un sistema acuoso, y concluyo que la formulación liposómica era superior a la administración acuosa (du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

Los sistemas liposómicos no iónicos también han sido examinados para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden surfactantes no iónicos y colesterol. Las formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearilo éter)

y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-estearilo éter) fueron utilizadas para administrar ciclosporina-A en la dermis de piel de ratón. Los resultados indicaron que tales sistemas liposómicos no iónicos fueron efectivos en facilitar la deposición de la ciclosporina-A en diferentes capas de la piel (Hue et al., S. T. P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466).

Los liposomas también incluyen liposomas “estéricamente estabilizados”, un término que, tal como se utiliza aquí, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en los liposomas, dan como resultado tiempos de vida de circulación potenciados con respecto a liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los cuales parte de la porción líquida que forma la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glicolípidos, tales como monosialogangliósido G_{M1}, o (B) es derivado con uno o más polímeros hidrofílicos, tales como una unidad estructural polietilen glicol (PEG). Mientras que no se desea está limitado por ninguna teoría particular, se cree en la técnica que, al menos para liposomas estabilizados estéricamente que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivados con PEG, la vida media de circulación potenciada de estos liposomas estabilizados estéricamente se deriva de un consumo reducido en las células del sistema retículoendotelial (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Diversos liposomas que comprenden uno o más glicolípidos son conocidos en la técnica. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) reportó la capacidad del monosialogangliósido G_{M1}, sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar la vida media en sangre de liposomas. Estos hallazgos fueron aprovechados por Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A., 1988, 85, 6949). La Patente de los Estados Unidos No. 4, 837,028 y WO 88/04924, ambas de Allen et al., divulgan liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido G_{M1} o un éster de sulfato de galactocerebrósido. La Patente de los Estados Unidos No. 5,543,152 (Webb et al.) divulga liposomas que comprenden esfingomielina. Liposomas que comprenden 1,2-*sn*-dimiristoilfosfatidilcolina están divulgados en WO 97/13499 (Lim et al.).

Muchos liposomas que comprenden lípidos derivados con uno o más polímeros hidrofílicos, y métodos para preparación de los mismos son conocidos en la técnica. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) describió liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C₁₂15G, que contienen una unidad estructural PEG. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) anotó que el recubrimiento hidrofílico de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado vidas medias en sangre significativamente potenciadas. Fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílicos de polialquilen glicoles (por ejemplo, PEG) son descritos por Sears (Patentes de los Estados Unidos Nos. 4, 426,330 y 4, 534,899). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describió experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidilo etanolamina (PE) derivados con PEG o estearato de PEG tienen significativos incrementos en las vidas medias de circulación en sangre. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) extendió tales observaciones a otros fosfolípidos derivados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formado a partir de la combinación de distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que contienen unidades estructurales PEG enlazadas covalentemente sobre su superficie externa están descritos en la Patente Europea No. EP 0 445 131 B1 y WO 90/04384 de Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen 1 - 20 por ciento molar de PE derivado con PEG, y métodos para uso de los mismos, están descritas por Woodle et al. (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,013,556 y 5,356,633) y Martin et al. (Patente de los Estados Unidos No. 5,213,804 y Patente Europea No. EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden un cierto número de otros conjugados lípido-polímeros están divulgados en WO 91/05545 y la Patente de los Estados Unidos No. 5, 225,212 (ambas de Martin et al.) y en la WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Los liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG están descritos en la WO 96/10391 (Choi et al.). Las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,540,935 (Miyazaki et al.) y 5,556,948 (Tagawa et al.) describen liposomas que contienen PEG que pueden ser llevados adicionalmente con unidades estructurales funcionales sobre sus superficies.

La WO 96/40062 de Thierry et al., divulga métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La Patente de los Estados Unidos 5, 264,221 de Tagawa et al., divulga liposomas enlazados a proteínas y establece que el contenido de tales liposomas puede incluir un ARN antisentido. La Patente de los Estados Unidos 5,665,710 de Rahman et al. describe cierto métodos de encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. La WO 97/04787 de Love et al. divulga liposomas que comprenden oligonucleótidos antisentido direccionados al gen raf.

Los transfersomas son todavía otro tipo de liposomas, y son agregados lipídicos altamente deformables que son candidatos atractivos para vehículos de administración de fármacos. Los transfersomas pueden ser descritos como gotitas de lípidos que son tan altamente deformables que pueden ser capaces fácilmente de penetrar a través de poros que son más pequeños que la gotita. Los transfersomas son adaptables al ambiente en el cual se utilizan, por ejemplo, son autooptimizantes (se adaptan a la forma de los poros en la piel), autorreparadores, frecuentemente alcanzan sus objetivos sin fragmentarse, y frecuentemente facilitan la autocarga. Para hacer transfersomas es posible agregar activadores de bordes superficiales, usualmente surfactantes, a una composición liposómica estándar. Los transfersomas han sido utilizados para administrar albumina de suero a la piel. La administración mediada por transfersomas de la albumina de suero ha demostrado ser tan efectiva como la inyección subcutánea de una solución que contiene albumina de suero.

- Los surfactantes encuentran amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La forma más común de clasificar y calificar las propiedades de los muchos diferentes tipos de surfactantes, tanto naturales como sintéticos, es mediante el uso del balance hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrofílico (también conocido como la "cabeza") provee el medio más útil para categorizar los diferentes surfactantes usados en formulaciones (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Decker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285).
- Si la molécula surfactante no está ionizada, se clasifica como un surfactante no iónico. Los surfactantes no iónicos encuentran amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y son utilizables en un amplio rango de valores de pH. En particular sus valores HLB varían de 2 a aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los surfactantes no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilen glicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitano, ésteres de sacarosa, y ésteres etoxilados. Alcanolaminas y éteres no iónicos tales como etoxilatos de alcoholes grasos, alcoholes propoxilados y polímeros de bloque etoxilados/propoxilados también están incluidos en esta clase. Los surfactantes de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de surfactantes no iónicos.
- Si la molécula del surfactante porta una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el surfactante se clasifica como aniónico. Surfactantes aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, lactilatos de acilo, acilamidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como sulfatos de alquilo y sulfatos de alquilo etoxilados, sulfonatos tales como sulfonatos de alquilo benceno, isetonatos de acilo, tauroatos de acilo y sulfosuccinatos y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de surfactantes aniónicos son los sulfatos de alquilo y los jabones.
- Si la molécula surfactante porta una carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el surfactante se clasifica como catiónico. Los surfactantes catiónicos incluyen sales de amonio cuaternarias y aminas etoxiladas. Las sales de amonio cuaternaria son los miembros más usados de esta clase.
- Si la molécula surfactante tiene la capacidad de portar bien sea una cara positiva o negativa, el surfactante se clasifica como anfotérico. Los surfactantes anfotéricos incluyen derivados de ácido acrílico, alquilo amida sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfátidos.
- Ha sido revisado el uso de surfactantes en productos de fármacos, formulaciones y en emulsiones (Rieger, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285).
- Excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral que no reaccionan de manera nociva con los ácidos nucleicos pueden ser utilizados para formular las composiciones de la presente invención. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilén glicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilo celulosa, polivinilo pirrolidona y similares.
- Las formulaciones para administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en solventes comunes tales como alcoholes, o soluciones de los ácidos nucleicos en bases oleosas líquidas o sólidas. Las soluciones también pueden contener reguladores, diluyentes y otros aditivos adecuados. Pueden ser usados excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables para administración no parenteral que no reaccionan nocivamente con los ácidos nucleicos.
- Excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, soluciones salinas, alcohol, polietilén glicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilo celulosa, polivinilo pirrolidona y similares.
- Administración pulsátil
- Los compuestos de la presente invención también pueden ser administrados por administración pulsátil. "Administración pulsátil" se refiere a una formulación farmacéutica que administra un primer pulso de fármaco (por ejemplo un compuesto antisentido) combinado con un potenciador de la penetración y un segundo pulso potenciador de la penetración para promover la absorción del fármaco que no está siendo absorbido por liberación con el primer pulso del potenciador de penetración.
- Una realización de la presente invención es una formulación oral de liberación retardada para absorción de fármaco intestinal potenciada que comprende:
- (a) una primera población de partículas portadoras que comprenden dicho fármaco y un potenciador de la penetración, en donde dicho fármaco y dicho potenciador de la penetración son liberados en una primera localización en el intestino; y
- (b) una segunda población de partículas portadoras que comprenden un potenciador de la penetración y una matriz o recubrimiento de liberación retardada, en donde el potenciador de penetración es liberado en una segunda

localización en el intestino corriente abajo de la primera localización, con lo cual la absorción del fármaco es potenciada cuando el fármaco alcanza la segunda localización.

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

- 5 Este potenciamiento es obtenido encapsulando al menos dos poblaciones de partículas portadoras. La primera población de partículas portadoras comprende una sustancia biológicamente activa y un potenciador de la penetración, y la segunda población (y opcionalmente adicional) de partículas portadoras comprende un potenciador de la penetración y un recubrimiento o matriz de liberación retardada.

- 10 Un “efecto de primer paso” que se aplica a fármacos administrados oralmente es la degradación debido a la acción de ácidos gástricos y diversas enzimas digestivas. Un medio para mejorar los efectos de eliminación de primer paso es incrementar la dosis de fármaco administrada, compensando de esta forma la proporción de fármaco perdido en la limpieza del primer paso. Aunque esto puede ser logrado fácilmente con la administración i.v., por ejemplo
15 proveyendo simplemente más del fármaco a un animal, otros factores influyen en la biodisponibilidad de los fármacos administrados a través de medios no parenterales. Por ejemplo, un fármaco puede ser degradado enzimáticamente o químicamente en el canal alimentario o en la corriente sanguínea y/o puede ser impermeable o semiimpermeable a diversas membranas mucosas.

También se contempla que estas composiciones farmacéuticas son capaces de potenciar la absorción de sustancias biológicamente activas cuando se administran a través de las rutas rectal, vaginal, nasal o pulmonar. También se contempla que la liberación de sustancias biológicamente activas puede ser alcanzada en cualquier parte del tracto gastrointestinal.

- 20 Las composiciones de oligonucleótidos farmacéuticas líquidas pueden ser preparadas combinando el oligonucleótido con un vehículo adecuado, por ejemplo agua estéril libre de pirógenos, o solución salina. Otros compuestos terapéuticos pueden ser incluidos opcionalmente.

- 25 La presente invención también contempla el uso de composiciones en partículas sólidas. Tales composiciones comprenden preferiblemente partículas de oligonucleótidos que son de tamaño respirable. Tales partículas pueden ser preparadas, por ejemplo, triturando oligonucleótidos secos por medios convencionales, por ejemplo con un mortero y pistilo, y luego pasando la composición de polvo resultante a través de un tamiz de malla 400 para segregar partículas grandes y aglomerados. Una composición de partículas sólidas compuesta de un oligonucleótido activo puede contener opcionalmente un dispersante que sirve para facilitar la formación de un aerosol, por ejemplo lactosa.

- 30 De acuerdo con la presente invención, las composiciones de oligonucleótidos pueden ser convertidas en aerosoles. La conversión en aerosoles de las partículas líquidas puede ser producida por cualquier medio adecuado, tal como un nebulizador. Véase, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos No. 4,501,729. Los nebulizadores son dispositivos disponibles comercialmente que transforman las soluciones o suspensiones en una neblina de aerosol terapéutico bien sea por medio de aceleración de un gas comprimido, típicamente aire u oxígeno, a través de un orificio venturi estrecho o por medio de agitación ultrasónica. Nebulizadores adecuados incluyen aquellos vendidos por Blairex® bajo el nombre PARI LC PLUS, PARI DURA-NEB 2000, PARI-BABY Size, PARI PRONEB Compressor with LC PLUS, PARI WALKHALER Compressor/Nebulizer System, PARI LC PLUS Reusable Nebulizer, y PARI LC Jet+® Nebulizer.

- 40 Las formulaciones para uso en nebulizadores pueden consistir de un oligonucleótido en un líquido, tal como en agua estéril libre de pirógenos, o solución salina, en donde el oligonucleótido comprende hasta aproximadamente 40% p/p de la formulación. Preferiblemente, el oligonucleótido comprende menos de 20% p/p. Si se desea, pueden agregarse aditivos adicionales tales como conservantes (por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo), antioxidantes y agentes saborizantes a la composición. Las partículas sólidas que comprenden un oligonucleótido también pueden ser convertidas en aerosol utilizando cualquier generador de aerosol de medicamento 5 en partículas sólidas conocida en la técnica. Tales generadores de aerosol producen partículas respirables, tal como se describieron anteriormente, y producen adicionalmente dosis medidas reproducibles por unidad de volumen de aerosol. Generadores de aerosol en partículas sólidas adecuados incluyen insufladores e inhaladores de dosis 10 medidas. Inhaladores de dosis medidas son utilizados en la técnica y son útiles en la presente invención.

- 50 Preferiblemente, los aerosoles líquidos o sólidos son producidos a una rata que va de aproximadamente 10 a 150 litros por minuto, más preferiblemente desde aproximadamente 30 a 150 litros por minuto y lo más preferiblemente aproximadamente 60 litros por minuto.

La biodisponibilidad potenciada de sustancias biológicamente activas también se alcanza a través de la administración oral de las composiciones de la presente invención.

Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de utilización establecidos por el arte. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales tales como, por ejemplo antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en formular físicamente diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, o pacificantes, agentes espesantes y estabilizadores. Sin embargo, tales materiales, cuando se agregan, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden ser esterilizadas y, si se desea, mezcladas con agentes auxiliares, por ejemplo lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humidificantes, emulsificantes, sales para influenciar la presión osmótica, reguladores, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interactúan nocivamente con los ácidos nucleicos de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilo celulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

Ciertas realizaciones de la invención proveen composiciones farmacéuticas que contienen (a) uno o más compuestos antisentido y (b) uno o más agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen pero no se limitan a daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinosido, biscloroetilnitrosurea, busulfan, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifen, dacarbazina, procarbazona, hexametilenamina, pentametilenamina, mitoxantrona amsacrina, clorambucilo, metilcicloexilnitrosurea, mostazas de nitrógeno, melfalan, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxyciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etoposido (VP-16), trimetrexato, irinotecan, topotecan, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, en general, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th, Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J.

Cuando se utilizan con los compuestos de la invención, tales agentes quimioterapéuticos pueden ser utilizados individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótidos), secuencialmente (por ejemplo 5-FU y oligonucleótidos durante un periodo de tiempo seguidos por MTX y oligonucleótidos), o en combinación con uno o más de otros tales agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótidos). Los fármacos antiinflamatorios, incluyendo pero no limitándose a fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, incluyendo pero no limitándose a ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden ser combinados en composiciones de la invención. Véase, en general, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th, Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N.J., páginas. 2499-2506 y 46-49, respectivamente). Otros agentes quimioterapéuticos no antisentido están también dentro del alcance de esta invención. Dos o más compuestos combinados pueden ser utilizados juntos o secuencialmente.

En otra realización relacionada, las composiciones de la invención pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, direccionados a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido direccionados a un segundo objetivo de ácido nucleico. Dos o más compuestos antisentido pueden ser utilizados juntos o secuencialmente.

Dosificación

La dosificación es dependiente de la severidad y respuesta del estado de la enfermedad que va a ser tratada, con el curso del tratamiento que dura desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectuó una cura o se alcance una disminución del estado de la enfermedad. Las programaciones de dosificación óptimas pueden ser calculadas a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Las personas de experiencia normal en la técnica pueden determinar fácilmente las dosificaciones óptimas, metodologías de dosificación y tasas de repetición.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención y no pretenden limitar la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de oligonucleótidos

Los oligodesoxinucleótidos no modificados son sintetizados en un sintetizador automatizado de ADN (Applied Biosystems modelo 380B) utilizando química de fosforamidita estándar con oxidación con yodo. Las β -cianoetil-diisopropil-fosforamiditas son adquiridas en Applied Biosystems (Foster City, CA). Para fosforotioato u oligonucleótidos, la botella de oxidación estándar fue reemplazada por una solución 0.2 M de 3H-1,2-benzoditiole-3 1,1-dióxido en acetonitrilo para la tiación paso a paso de los enlaces fosfito. La etapa de espera del ciclo de tiación fue incrementada a 68 segundos y fue seguida por la etapa de cubrimiento. Las citosinas pueden ser 5-metilo

citiosinas. (5-metilo desoxicitidin fosforamiditas disponibles de Glen Research, Sterling, VA o Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Los 2'-metoxi oligonucleótidos son sintetizados utilizando 2'-metoxi β-cianoetildiisopropil-fosforamiditas (Chemgenes, Needham, MA) y el ciclo estándar para oligonucleótidos no modificados, excepto la etapa de espera después del suministro pulsado de tetrasol y base se incrementa a 360 segundos. Otros 2'-alcoxi oligonucleótidos son sintetizados por una modificación de este método, utilizando amiditas modificadas en 2' apropiadas tales como las disponibles de Glen Research, Inc., Sterling, VA.

Los 2'-fluor u oligonucleótidos son sintetizados como lo describe Kawasaki et al. (J. Med. Chem. 1993, 36, 831-841). En resumen, el nucleósido protegido N⁶-benzoil-2'-desoxi-2'-fluoroadenosina es sintetizado utilizando como material de partida 9-β-D-arabinofuranosiladenina disponible comercialmente y modificando los procedimientos de la literatura con lo cual el átomo en 2'-a-fluoro es introducido mediante un desplazamiento S_N2 de un grupo 2'-β-O-trifilo. Así la N⁶-benzoil-9-β-D-arabinofuranosiladenina es protegida selectivamente en un rendimiento moderado como el intermediario 3',5'-ditetrahidropiraniolo (THP). La desprotección del THP y de los grupos N⁶-benzoilo se lleva a cabo utilizando metodologías estándar y se usan métodos estándar para obtener los intermediarios 5'-dimetoxitritil-(DMT) y 5'-DMT-3'-fosforamidita.

La síntesis de la 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina es lograda utilizando el 9-β-D-arabinofuranosilguanina protegida con tetraisopropildisiloxanilo (TPDS) como material de partida, y la conversión al intermediario diisobutiril-arabinofuranosilguanina. La desprotección del grupo TPDS es seguida por la protección del grupo hidroxilo con THP para dar la arabinofuranosilguanina protegida con diisobutiril di-THP. La O-desacilación y la trifilación selectiva es seguida por el tratamiento del producto crudo con fluoruro, y luego la desprotección de los grupos THP. Se utilizan metodologías estándar para obtener las 5'-DMT- y 5'-DMT-3'-fosforamiditas.

La síntesis de la 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina es lograda mediante la modificación de un procedimiento conocido en el cual la 2, 2¹-anhidro-1-β-D-arabinofuranosiluracilo es tratada con fluoruro de hidrógeno-piridina al 70%. Se utilizan procedimientos estándar para obtener las 5'-DMT y 5'-DMT-3'fosforamiditas.

La 2'-desoxi-2'-fluorocitidina es sintetizada a través de la aminación de la 2'-desoxi-2'-fluorouridina, seguida por la protección selectiva para dar N⁴-benzoil-2'-desoxi-2'-fluorocitidina. Se utilizan procedimientos estándar para obtener las 5'-DMT y 5'-DMT-3'fosforamiditas.

Las amiditas modificadas con 2'-(2-metoxietilo) fueron sintetizadas de acuerdo con Martin, P. (Helv. Chim. Acta 1995, 78, 486-506). Para facilidad de síntesis, el último nucleótido puede ser un desoxinucleótido. Las 2'-O-CH₂CH₂OCH₃- citiosinas pueden ser 5-metilo citiosinas.

Síntesis de monómeros de 5-metilo citosina:

2,2'-Anhido[1-(β-D-arabinofuranosil)-5-metiluridina]:

La 5-metiluridina (ribosil timina, disponible comercialmente a través de Yamasa, Choshi, Japón), (72.0 g, 0.279 M), difenilcarbonato (90.0 g, 0.420 M) y bicarbonato de sodio (2.0 g, 0.024 M) fueron agregados a DMF (300 mL). La mezcla fue calentada hasta reflujo, con agitación, permitiendo que el dióxido de carbono desprendido fuera liberado de manera controlada. Después de 1 hora, la solución ligeramente oscurecida fue concentrada bajo presión reducida. El jarabe resultante fue vertido sobre dietiléter (2.5 L) con agitación. El producto formó una goma. El éter fue decantado y el residuo fue disuelto en una cantidad mínima de metanol (cerca de 400 ml). La solución fue vertida sobre éter fresco (2.5 L) para producir una goma viscosa. El éter fue decantado y la goma fue secada en un horno al vacío (60°C a 1 mm de Hg durante 24 horas) para dar un sólido el cual fue triturado para dar un polvo color bronce claro (57 g, 85% de rendimiento crudo). El material fue utilizado como tal para reacciones posteriores.

2'-O-Metoxietil-5-metiluridina:

2,2'-Anhido-5-metiluridina (195 g, 0.81 M), tris (2-metoxietil)borato (231 g, 0.98 M) y 2-metoxietanol (1.2 L) fueron agregados a un recipiente a presión de acero inoxidable de 2 L y colocado en un baño de aceite precalentado a 160°C. Después de calentar durante 48 horas a 155 - 160°C, el recipiente fue abierto y la solución evaporada hasta sequedad y triturada con MeOH (200 mL). El residuo fue suspendido en acetona caliente (1 L). Las sales insolubles fueron filtradas, lavadas con acetona (150 mL) y el filtrado fue evaporado. El residuo (280 g) fue disuelto en CH₃CN (600 mL) y evaporado. Se empaco una columna de sílica gel (3 kg) con CH₂Cl₂/acetona/MeOH (20:5:3) que contenía 0.5% de Et₃NH. El residuo fue disuelto en CH₂Cl₂ (250 mL) y adsorbido sobre sílica (150 g) antes de cargarlo sobre la columna. El producto fue eluido con el solvente de empaque para dar 160 g (63%) de producto.

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

2'-O-Metoxietil-5-metiluridina (160 g, 0.506 M) fue coevaporado con piridina (250 mL) y el residuo seco fue disuelto en piridina (1.3 L). Se agregó una primera alícuota de cloruro de dimetoxitritilo (94.3 g, 0.278 M) y la mezcla fue agitada a temperatura ambiente durante 1 hora. Se agregó una segunda alícuota de cloruro de dimetoxitritilo (94.3 g, 0.278 M) y la reacción se agito durante 1 hora adicional. Se agregó entonces metanol (170 mL) para detener la

reacción. La HPLC mostró la presencia de aproximadamente 70% de producto. El solvente fue evaporado y triturado con CH₃CN (200 mL). El residuo fue disuelto en CHCl₃ (1.5 L) y extraído con 2x500 mL de NaHCO₃ saturado y 2x500 mL de NaCl saturado. La fase orgánica fue secada sobre Na₂SO₄, filtrada y evaporada. Se obtuvieron 275 g de residuo. El residuo fue purificado sobre una columna de sílica gel de 3.5 kg, empacada y eluida con EtOAc/hexano/acetona (5:5:1) que contenía 0.5% de Et₃NH. Las fracciones puras fueron evaporadas para dar 164 g de producto. Se obtuvieron aproximadamente 20 g adicionales a partir de las fracciones impuras para dar un rendimiento total de 183 g (57%).

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

2'-O-Metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metil-uridina (106 g, 0.167 M), de DMF/piridina (750 mL de una mezcla 3:1 preparada a partir de 562 mL de DMF y 188 mL de piridina) y anhídrido acético (24.38 mL, 0.258 M) fueron combinados y agitados a temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción fue monitoreada por tlc congelando primero la muestra de tlc con la adición de MeOH. Al terminar la reacción, según criterio por tlc, se agregó MeOH (50 mL) y la mezcla se evaporó a 35°C. El residuo fue disuelto en (CHCl₃ (800 mL) y extraído con 2x200 mL de bicarbonato de sodio saturado y 2x200 mL de NaCl saturado. Las capas acuosas fueron reextraídas con 200 mL de CHCl₃. Las fases orgánicas combinadas fueron secadas con sulfato de sodio y evaporadas para dar 122 g de residuo (aproximadamente 90% de producto). El residuo fue purificado sobre una columna de sílica gel de 3.5 kg y eluido utilizando EtOAc/hexano (4:1). Las fracciones de producto puro fueron evaporadas para generar 96 g (84%).

3'-O-Acetil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metil-4-triazoleuridina:

Se preparó una primera solución disolviendo 3'-O-acetil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metiluridina (96 g, 0.144 M) en CH₃CN (700 mL) y se dejó en reposo. Se agregó trietilamina (189 mL, 1.44 M) a una solución de triazol (90 g, 1.3 M) en CH₃CN (1 L), se enfrió a -5°C y se agito durante 0.5 horas utilizando un agitador superior. Se agregó gota a gota POCl₃, durante un periodo de 30 minutos, a la solución en agitación mantenida a 0 - 10°C, y la mezcla resultante se agito durante 2 horas adicionales. La primera solución fue agregada gota a gota, a lo largo de un periodo de 45 minutos, a la última solución. La mezcla de reacción resultante fue almacenada durante la noche en un cuarto frío. Las sales fueron filtradas de la mezcla de reacción y la solución fue evaporada. El residuo fue disuelto en EtOAc (1 L) y los sólidos insolubles fueron retirados por filtración. El filtrado fue lavado con 1x300 mL de NaHCO₃ y 2x300 mL de NaCl saturado, se seco sobre sulfato de sodio y se evaporó. El residuo fue triturado con EtOAc para dar el compuesto del título.

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

Una solución de 3'-O-acetil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metil-4-triazoleuridina (103 g, 0.141 M) en dioxano (500 mL) y NH₄OH (30 mL) fue agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución en dioxano fue evaporada y el residuo fue convertido en un azeótropo con MeOH (2x200 mL). El residuo fue disuelto en MeOH (300 mL) y transferido a un recipiente a presión de acero inoxidable de 2 litros. Se agregó MeOH (400 mL) saturado con gas NH₃ y el recipiente fue calentado a 100°C durante 2 horas (la tlc mostro conversión completa). El contenido del recipiente fue evaporado hasta sequedad y el residuo fue disuelto en EtOAc (500 mL) y lavado una vez con NaCl saturado (200 mL). Las fases orgánicas fueron secadas sobre sulfato de sodio y el solvente fue evaporado para dar 85 g (95%) del compuesto del título.

N⁴-Benzoil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metilcitidina:

2'-O-Metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metil-citidina (85 g, 0.134 M) fue disuelto en DMF (800 mL) y se agregó anhídrido benzoico (37.2 g, 0.165 M) con agitación. Después de agitar durante 3 horas, la tlc mostró que la reacción estaba terminada en aproximadamente 95%. El solvente fue evaporado y el residuo fue convertido en azeótropo con MeOH (200 mL). El residuo fue disuelto en CHCl₃ (700 mL) y extraído con NaHCO₃ saturado (2x300 mL) y NaCl saturado (2x300 mL), secado sobre MgSO₄ y evaporado para dar un residuo (96 g). El residuo fue sometido a cromatografía sobre una columna de sílica de 1.5 kg utilizando EtOAc/hexano (1:1) que contenía 0.5% de Et₃NH como solvente de elución. Las fracciones de producto puro fueron evaporadas para dar 90 g (90%) del compuesto del título.

N⁴-Benzoil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metilcitidina-3'-amidita:

Se disolvió N⁴-Benzoil-2'-O-metoxietil-5'-O-dimetoxitritil-5-metilcitidina (74 g, 0.10 M) en CH₂Cl₂ (1 L). Se agregaron tetrazol diisopropilamina (7.1 g) y 2-cianoetoxi-tetra(isopropil)fosfito (40.5 mL, 0.123 M) con agitación, bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante fue agitada durante 20 horas a temperatura ambiente (la tlc mostró que la reacción estaba terminada en un 95%). La mezcla de reacción fue extraída con NaHCO₃ saturado (1x300 mL) y NaCl saturado (3x300 mL). Los lavados acuosos fueron retroextraídos con CH₂Cl₂ (300 mL), y los extractos fueron combinados, secados sobre MgSO₄ y concentrados. El residuo obtenido fue sometido a cromatografía sobre una columna de sílica de 1.5 kg usando EtOAc/hexano (3:1) como solvente de elución. Las fracciones puras fueron combinadas para dar 90.6 g (87%) del compuesto del título.

Los oligonucleótidos que contenían 5-metil-2'-desoxicitidina (5-me-C) fueron sintetizado de acuerdo con métodos publicados (Sanghvi et al., Nucl. Acids Res. 1993, 21, 3197-3203) utilizando fosforamiditas disponibles comercialmente (Glen Research, Sterling VA o ChemGenes, Needham MA).

2'-O-(dimetilaminooxietil) nucleósido amiditas

- 5 2'-(Dimetilaminooxietoxi) nucleósido amiditas [también conocido en la técnica como 2'-O-(dimetilaminooxietil) nucleósido amiditas] se preparan como se describe en los siguientes párrafos. Las adenosina, citidina y guanosina nucleósido amiditas se preparan de manera similar a la timidina (5-metiluridina) excepto que las aminas exocíclicas están protegidas con una unidad estructural benzoilo en el caso de la adenosina y citida y con isobutirilo en el caso de la guanosina.

10 5'-O-*tert*-Butildifenilsilil-O²-2'-anhidro-5-metiluridina

- O²-2'-anhidro-5-metiluridina (Pro. Bio. Sint., Varese, Italia, 100.0g, 0.416 mmol), dimetilaminopiridina (0.66g, 0.013eq, 0.0054mmol) se disolvieron en piridina seca (500 ml) a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón y con agitación mecánica. Se agregó *tert*-butildifenilo clorosilano (125.8g, 119.0mL, 1.1eq, 0.458mmol) en una porción. La reacción fue agitada durante 16 horas a temperatura ambiente. La TLC (R_f 0.22, acetato de etilo) indico una reacción completa. La solución fue concentrada bajo presión reducida hasta un aceite espeso. Este fue sometido a partición entre diclorometano (1 L) y bicarbonato de sodio saturado (2x1 L) y salmuera (1 L). La capa orgánica fue secada sobre sulfato de sodio y concentrada bajo presión reducida hasta dar un aceite espeso. El aceite fue disuelto en una mezcla 1:1 de acetato de etilo y etilo éter (600mL) y la solución fue enfriada hasta -10°C. El producto cristalino resultante fue recogido por filtración, lavado con etilo éter (3x200 mL) y secado (40°C, 1mm Hg, 24 h), hasta obtener 149g (74.8%) de sólido blanco. La TLC y la NMR fueron consistentes con el producto puro.

5'-O-*tert*-Butildifenilsilil-2'-O-(2-hidroxi)etil-5-metiluridina

- En un reactor a presión sin agitación de acero inoxidable de 2 L se agregó borano en tetrahidrofurano (1.0 M, 2.0 eq, 622 mL). En la cabina de extracción y con agitación manual, se agregó etilen glicol (350 mL, exceso) cuidadosamente al principio hasta que se remitió la evolución de gas hidrógeno. Se agregaron 5'-O-*tert*-Butildifenilsilil-O²-2'-anhidro-5-metiluridina (149 g, 0.311 mol) y bicarbonato de sodio (0.074 g, 0.003 eq) con agitación manual. El reactor fue sellado y calentado en un baño de aceite hasta que se alcanzo una temperatura interna de 160°C y luego se mantuvo durante 16 horas (presión < 100 psig). El recipiente de reacción fue enfriado hasta temperatura ambiente y abierto. La TLC (R_f 0.67 para el producto deseado y R_f 0.82 para el producto colateral ara-T, acetato de etilo), una conversión de aproximadamente 70% al producto. Con el fin de evitar formación adicional de productos secundarios la reacción fue detenida, concentrada bajo presión reducida (10 a 1mm de Hg) en un baño de agua tibia (40 - 100°C) con las condiciones más extremas utilizadas para eliminar el etilen glicol.

- [Alternativamente, una vez que se elimina el solvente de bajo punto de ebullición, la solución remanente puede ser sometida a partición entre acetato de etilo y agua. El producto estará en fase orgánica]. El residuo fue purificado por cromatografía de columna (2 kg de sílica gel, gradiente de acetato de etilo-hexanos 1:1 a 4:1). Las fracciones apropiadas fueron combinadas, lavadas y secadas para producir una espuma blanca brillante (84 g, 50%), material de partida contaminado (17.4 g) y material de partida puro reutilizable 20 g. El rendimiento basado en el material de partida menos el material de partida recuperado puro fue de 58%. La TLC y la RMN fueron consistentes con el producto puro al 99%.

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

- 5'-O-*tert*-Butildifenilsilil-2'-O-(2-hidroxi)etil-5-metiluridina (20g, 36.98mmol) fue mezclada con trifenilfosfina (11.63g, 44.36mmol) y N-hidroxifitalimida (7.24g, 44.36mmol). Se seco entonces sobre P₂O₅ bajo alto vacío durante 2 días a 40°C. La mezcla de reacción fue purgada con argón y THF seco (369 mL, Aldrich botella con sello seguro) fue agregado para obtener una solución clara. Se agregó dietil- azodicarboxilato (6.98mL, 44.36mmol) gota a gota a la mezcla de reacción. La rata de adición se mantiene de tal forma que la coloración rojo profundo resultante es descargada justo antes de agregar la siguiente gota. Después de que la adición termino, la reacción fue agitada durante 4 horas. En ese momento la TLC mostró la terminación de la reacción (acetato de etilo:hexano, 60:40). El solvente fue evaporado al vacío. El residuo obtenido fue colocado en una columna instantánea y eluido con acetato de etilo:hexano (60:40), para obtener 2'-O-([2-phthalimidoxi)etil]-5'-*t*-butildifenilsilil-5-metiluridina en forma de una espuma blanca (21.81g, 86%).

5'-O-*tert*-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadoximinooxi)etil]-5-metiluridina

- Se disolvió 2'-O-([2-phthalimidoxi)etil]-5'-*t*-butildifenilsilil-5-metiluridina (3.1g, 4.5mmol) en CH₂Cl₂ seco (4.5mL) y metilhidrazina (300mL, 4.64mmol) fue agregada gota a gota a -10°C hasta 0°C. Después de 1 hora la mezcla fue filtrada, el filtrado fue lavado con CH₂Cl₂ enfriado en hielo y la fase orgánica combinada fue lavada con agua, salmuera y secada sobre Na₂SO₄. La solución fue concentrada para obtener la 2'-O-(aminooxietil) timidina, la cual fue disuelta entonces en MeOH (67.5mL). A esto se agregó formaldehido (solución acuosa al 20%, p/p, 1.1eg.) y se

mezcla durante 1 hora. El solvente fue eliminado bajo vacío; el residuo se sometió a cromatografía para obtener 5'-O-*tert*-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadroximinooxi) etil]-5-metiluridina como una espuma blanca (1.95, 78%).

5'-O-*tert*-Butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxietil]-5-metiluridina

5'-O-*tert*-butildifenilsilil-2'-O-[(2-formadroximinooxi) etil]-5-metiluridina (1.77g, 3.12mmol) fue disuelto en una solución de p-toluenosulfonato de piridinio (PPTS) 1M en MeOH (30.6mL). Se agregó cianoborohidruro de sodio (0.39g, 6.13mmol) a esta solución a 10°C bajo atmósfera inerte. La mezcla de reacción fue agitada durante 10 minutos a 10°C. Después de que el recipiente de reacción había sido retirado del baño de hielo y agitado a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción monitoreada por TLC (5% de MeOH en CH₂Cl₂). Se agregó solución acuosa de NaHCO₃ (5%, 10mL) y se extrajo con acetato de etilo (2x20mL). La fase de acetato de etilo fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro, y se evaporó hasta sequedad. El residuo fue disuelto en una solución de PPTS 1M en MeOH (30.6mL). Se agregó formaldehído (20% p/p, 30mL, 3.37mmol) y la mezcla de reacción fue sometida a agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos. La mezcla de reacción se enfrió a 10°C en un baño de hielo, se agregó cianoborohidruro de sodio (0.39g, 6.13mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 10°C durante 10 minutos. Después de 10 minutos, la mezcla de reacción fue retirada al baño de hielo y agitada a temperatura ambiente durante 2 horas. A la mezcla de reacción, se agregó solución de NaHCO₃ al 5% (25mL) y se extrajo con acetato de etilo (2x25mL). La capa de acetato de etilo fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y evaporada hasta sequedad. El residuo obtenido fue purificado por cromatografía de columna instantánea y se eluyó con MeOH al 5% en CH₂Cl₂ para obtener 5'-O-*tert*-butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxietil]-5-metiluridina en forma de una espuma blanca (14.6g, 80%).

2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina

Se disolvió trihidrofluoruro de trietilamina (3.91mL, 24.0mmol) en THF seco y trietilamina (1.67mL, 12mmol, seco, mantenido sobre KOH). Esta mezcla de trietanolamina-2HF fue agregada entonces a 5'-O-*tert*-butildifenilsilil-2'-O-[N,N-dimetilaminooxietil]-5-metiluridina (1.40g, 2.4mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La reacción fue monitoreada por TLC (MeOH al 5% en CH₂Cl₂). El solvente fue retirado bajo vacío y el residuo colocado en una columna instantánea y eluido con MeOH al 10% en CH₂Cl₂ para obtener la 2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina (766mg, 92.5%).

5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina

Se secó 2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina (750mg, 2.17mmol) sobre P₂O₅ bajo alto vacío durante la noche a 40°C. Se coevaporó entonces con piridina anhidra (20mL). El residuo obtenido fue disuelto en piridina (11mL) bajo atmósfera de argón. Se agregaron a la mezcla 4-dimetilaminopiridina (26.5mg, 2.60mmol), cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (880mg, 2.60mmol) a la mezcla y la mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente hasta que todo el material de partida desapareció. Se retiró la piridina bajo vacío y el residuo fue sometido a cromatografía y eluido con MeOH al 10% en CH₂Cl₂ (contenía unas pocas gotas de piridina) para obtener 5'-O-DMT-2'-O-(dimetilamino-oxietil)-5-metiluridina (1.13g, 80%).

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

5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina (1.08g, 1.67mmol) fue coevaporado con tolueno (20mL). Al residuo se agregó N,N-diisopropilamina tetrazonido (0.29 g, 1.67 mmol) y se seco sobre P₂O₅ bajo alto vacío durante la noche a 40°C. Entonces la mezcla de reacción fue disuelta en acetonitrilo anhidro (8.4mL) y 2-cianoetil-N,N,N¹,N¹-tetraisopropilfosforamidita (2.12 mL, 6.08mmol) fue agregado. La mezcla de reacción fue agitada a temperatura ambiente durante 4 horas bajo atmósfera inerte. El avance de la reacción fue monitoreado por TLC (hexano:acetato de etilo 1:1). El solvente fue evaporado, luego el residuo fue disuelto en acetato de etilo (70 mL) y lavado con NaHCO₃ acuoso al 5% (40 mL). La capa de acetato de etilo fue secada sobre Na₂SO₄ anhidro y concentrada. El residuo obtenido fue sometido a cromatografía (acetato de etilo como eluyente) para obtener 5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimetilaminooxietil)-5-metiluridina-3'-[(2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita] en forma de una espuma (1.04g, 74.9%).

Los oligonucleótidos que tienen esqueletos metilen (metilimino) (MMI) son sintetizados de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos 5, 378, 825. Para facilidad de síntesis, se sintetizaron diversos dímeros de nucleósidos que contenían enlaces MMI y se incorporaron en los oligonucleótidos. Otros esqueletos que contienen nitrógeno también fueron sintetizados de acuerdo con WO 92/20823.

Los oligonucleótidos que tienen esqueletos amidas se sintetizan de acuerdo con De Mesmaeker et al. (Acc. Chem. Res. 1995, 28, 366-374). La unidad estructural amida es fácilmente accesible mediante métodos sintéticos simples y bien conocidos y es compatible con las condiciones requeridas para la síntesis en fases sólidas de los oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos con esqueleto morfolino son sintetizados de acuerdo con la Patente de los Estados Unidos 5,034,506 (Summerton y Weller).

Los oligómeros del ácido péptidonucleico (PNA) se sintetizan de acuerdo con P.E. Nielsen et al. (Science 1991, 254, 1497-1500).

- Después de la escisión desde la columna de vidrio de poro controlado (Applied Biosystems) y desbloqueo en hidróxido de amonio concentrado a 55°C durante 18 horas, los oligonucleótidos son purificados por precipitación dos veces desde NaCl 0.5 M con 2.5 volúmenes de etanol. Los oligonucleótidos sintetizados fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida sobre geles desnaturalizantes o electroforesis por gel capilar y se juzgó que eran al menos 85% de material completo. Las cantidades relativas de los enlaces de fosforotioato y fosfodiéster obtenidas en la síntesis fueron verificadas periódicamente por espectroscopía de resonancia magnética nuclear ³¹P, y para algunos estudios los oligonucleótidos fueron purificados por HPLC como lo describen Chiang et al. (J. Biol. Chem. 1991, 266, 18162). Los resultados obtenidos con el material purificado por HPLC fueron similares a los obtenidos con material no purificado por HPLC.

- Alternativamente, se sintetizaron oligonucleótidos en formato de placa de 96 pozos a través de química de fosforamidita P(III) en fase sólida en un sintetizador automatizado capaz de ensamblar 96 secuencias simultáneamente en un formato estándar de 96 pozos. Los enlaces fosfodiéster internucleótidos fueron logrados por oxidación con yodo acuoso. Los enlaces fosforotioato internucleótidos fueron generados por sulfuración utilizando 1,1 dióxido de 3,4-dihidro-2H-pyridin-2-ona (Beaucage Reagent) en acetonitrilo anhidro. Las beta-cianoetil-diisopropilo fosforamiditas estándar protegidas con base fueron obtenidas de proveedores comerciales (por ejemplo, PE-Applied Biosystems, Foster City, CA, o Pharmacia, Piscataway, NJ). Los nucleósidos no estándar son sintetizados según métodos publicados. Se utilizan como beta-cianoetil-diisopropilo fosforamiditas protegidas con bases.

- Los oligonucleótidos fueron escindidos del soporte y desprotegidos con NH₄OH concentrado a temperatura elevada (55 - 60°C) durante 12 - 16 horas y el producto liberado fue secado entonces *in vacuo*. El producto secado fue resuspendido entonces en agua estéril para producir una placa maestra desde la cual todas las muestras analíticas y de prueba fueron diluidas entonces utilizando pipeteadores robóticos:

Ejemplo 2: Secuencias de oligodesoxinucleótidos de STAT3 humana

- Los oligonucleótidos antisentido fueron diseñados para direccionar STAT3 humana. Los datos de secuencia objetivo fueron de la secuencia APRF cADN publicada por Akira, S. et al. (Cell, 1994, 77, 63-71); número de acceso GenBank® L29277 provista aquí como SEQ ID NO: 1. Una serie de oligodesoxinucleótidos fue sintetizada con enlaces fosforotioato. Las 2'-desoxi citosinas fueron 5-metil citosinas. Estas secuencias de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 1. Un conjunto adicional de oligonucleótidos fue sintetizado con u oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con brecha") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región central de "brecha" de diez 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todas las 2'-MOE citosinas y 2'-desoxi citosinas fueron 5-metil-citosinas.

- Estas secuencias de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 2.

Una línea celular apropiada, que expresa típicamente altos niveles de STAT3, se escoge para los estudios *in vitro*. Las condiciones de cultivo celular son las estándar para esa línea celular en particular. El tratamiento con oligonucleótidos fue durante 4 horas y el ARNm se aisló usualmente durante 24 a 48 horas después del tratamiento inicial. El ARNm es aislado utilizando el kit RNeasy7 (Qiagen, Santa Clarita, CA).

- Tabla 1:

Secuencia de nucleótidos de fosforotioato u oligodesoxinucleótidos STAT3 humanos				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' - 3')	SEQ ID NO:	Coordenados de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
106691	GTCTGCGCCGCCGCCCGAA	2	0010-0029	5'-UTR
106692	GGCCGAAGGGCCTCTCCGAG	3	0130-0149	5'-UTR
106693	TCCTGTTTCTCCGGCAGAGG	4	0202-0221	AUG
106694	CATCCTGTTTCTCCGGCAGA	5	0204-0223	AUG
106695	GCCATCCTGTTTCTCCGGCA	6	0206-0225	AUG
106696	GGGCCATCCTGTTTCTCCGG	7	0208-0227	AUG
106697	TTGGGCCATCCTGTTTCTCC	8	0210-0229	AUG

ES 2 521 599 T3

Secuencia de nucleótidos de fosforotioato u oligodesoxinucleótidos STAT3 humanos				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' - > 3')	SEQ ID NO:	Coordenados de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
106698	CATTGGGCCATCCTGTTTCT	9	0212-0231	AUG
106699	TCCATTGGGCCATCCTGTTT	10	0214-0233	AUG
106700	ATTCCATTGGGCCATCCTGT	11	0216-0235	AUG
106701	TGATTCCATTGGGCCATCCT	12	0218-0237	AUG
106702	GCTGATTCCATTGGGCCATC	13	0220-0239	AUG
106703	TAGCTGATTCCATTGGGCCA	14	0222-0241	AUG
106704	TGTAGCTGATTCCATTGGGC	15	0224-0243	Codificación
106705	CTGTAGAGCTGATGGAGCTG	16	0269-0288	Codificación
106706	CCCAATCTTGACTCTCAATC	17	0331-0350	Codificación
106707	CCCAGGAGATTATGAAACAC	18	0386-0405	Codificación
106708	ACATTCGACTCTTGACAGAA	19	0431-0450	Codificación
106709	TCTGAAGAACTGCTTGATT	20	0475-0494	Codificación
106710	GGCCACAATCCGGGCAATCT	21	0519-0538	Codificación
106711	TGGCTGCAGTCTGTAGAAGG	22	0562-0581	Codificación
106712	CTGCTCCAGCATCTGCTGCT	23	0639-0658	Codificación
106713	TTTCTGTTCTAGATCCTGCA	24	0684-0703	Codificación
106714	TAGTTGAAATCAAAGTCATC	25	0728-0747	Codificación
106715	TTCCATTGATCTTGTCATG	26	0772-0791	Codificación
106716	TCTGTTCCAGCTGCTGCATC	27	0817-0836	Codificación
106717	TCACTCACGATGCTTCTCCG	28	0860-0879	Codificación
106718	GAGTTTTCTGCACGTACTCC	29	0904-0923	Codificación
106719	ATCTGTTGCCGCTCTTCCA	30	0947-0968	Codificación
106720	CTAGCCGATCTAGGCAGATG	31	0991-1010	Codificación
106721	CGGGTCTGAAGTTGAGATTC	32	1034-1053	Codificación
106722	CGGCCGGTGCTGTACAATGG	33	1110-1129	Codificación
106723	TTTCATTAAGTTTCTGAACA	34	1155-1174	Codificación
106724	AGGATGCATGGGCATGCAGG	35	1200-1219	Codificación
106725	GACCAGCAACCTGACTTTAG	36	1260-1279	Codificación
106726	ATGCACACTTTAATTTTAAG	37	1304-1323	Codificación
106727	TTCCGGGATCCTCTGAGAGC	38	1349-1368	Codificación
106728	TTCCATGTTCACTTTTG	39	1392-1411	Codificación
106729	GTCAAGTGTGTAATTCTGC	40	1436-1455	Codificación
106730	CAATCAGGGAAGCATCACAA	41	1495-1514	Codificación

Secuencia de nucleótidos de fosforioato u oligodesoxinucleótidos STAT3 humanos				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' - > 3')	SEQ ID NO:	Coordenados de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
106731	TACACCTCGGTCTCAAAGGT	42	1538-1557	Codificación
106732	TGACAAGGAGTGGGTCTCTA	43	1581-1600	Codificación
106733	CGCCCAGGCATTTGGCATCT	44	1626-1645	Codificación
106734	CATTCTTGGGATTGTTGGTC	45	1669-1688	Codificación
106735	CACTTGGTCCCAGGTTCCAA	46	1713-1732	Codificación
106736	CCCGCTTGGTGGTGGACGAG	47	1756-1775	Codificación
106737	AGTTCACACCAGGCCCTAGG	48	1816-1835	Codificación
106738	GTTTTCTTTGCAGAAGTTAG	49	1860-1879	Codificación
106739	ATATTGTCTAGCCAGACCCA	50	1904-1923	Codificación
106740	AACCCATGATGTACCCTTCA	51	1963-1982	Codificación
106741	GCTTAGTGCTCAAGATGGCC	52	2005-2024	Codificación
106742	GCTGCTTTCACTGAAGCGCA	53	2043-2062	Codificación
106743	GTGAAAGTGACGCCTCCTTC	54	2066-2085	Codificación
106744	CTGATGTCCTTCTCCACCCA	55	2087-2106	Codificación
106745	ACTGGATCTGGGTCTTACCG	56	2107-2126	Codificación
106746	AAATGACATGTTGTTCACT	57	2151-2170	Codificación
106747	GCCCATGATGATTTCAAGCA	58	2169-2188	Codificación
106748	TATTGGTAGCATCCATGATC	59	2194-2213	Codificación
106749	ATAGACAAGTGGAGACAACA	60	2217-2236	Codificación
106750	TTGGGAATGTCAGGATAGAG	61	2237-2256	Codificación
106751	CTCCTGGCTCTCTGGCCGAC	62	2280-2299	Codificación
106752	ACCTGGGTCAGCTTCAGGAT	63	2301-2320	Codificación
106753	CACAGATAAACTTGGTCTTC	64	2338-2357	Codificación
106754	ATCGGCAGGTCAATGGTATT	65	2378-2397	Codificación
106755	CCAACTGCATCAATGAATC	66	2414-2433	Codificación
106756	GGTTCAGCACCTTCACCATT	67	2438-2457	Codificación
106757	GAGGGACTCAAAGTCCCTC	68	2466-2485	Codificación
106758	CAACTCCATGTCAAAGGTGA	69	2484-2503	Codificación
106759	TTCTCAGCTCCTCACATGGG	70	2525-2544	Detención
106760	CGTTCTCAGCTCCTCACATG	71	2527-2546	Detención
106761	TCCGTTCTCAGCTCCTCACA	72	2529-2548	Detención
106762	CTTCCGTTCTCAGCTCCTCA	73	2531-2550	Detención
106763	AGCTTCCGTTCTCAGCTCCT	74	2533-2552	Detención

Secuencia de nucleótidos de fosforotioato u oligodesoxinucleótidos STAT3 humanos				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' - > 3')	SEQ ID NO:	Coordinados de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
106764	AGAATGCAGGTAGGCGCCTC	75	2569-2588	3'-UTR
106765	ACCACAAAGTTAGTAGTTTC	76	2623-2642	3'-UTR
106766	TGCTCAAAGATAGCAGAAGT	77	2665-2684	3'-UTR
106767	ATCACTCATTTCTCTATTT	78	2701-2720	3'-UTR
106768	CATTTAGATAAAAGCAGATC	79	2727-2746	3'-UTR
106769	ACATCCTTATTTGCATTTAG	80	2740-2759	3'-UTR
106770	GATCATGGGTCTCAGAGAAC	81	2760-2779	3'-UTR
¹ Los residuos "C" son 5-metil-citosinas; todos los enlaces son enlaces fosforotioato.				
² Coordenadas de GenBank® Accession No. L29277, nombre de locus "HUMAPRF", SEQ ID NO: 1.				

Tabla 2:

Secuencia de nucleótidos de fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos de STAT3 humanos (con brecha desoxi)				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' - > 3')	SEQ ID NO:	Coordinados de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
106771	GTCTGCGCCGCGCCCGCGAA	2	0010-0029	5'-UTR
106772	GGCCGAAGGGCCTCTCCGAG	3	0130-0149	5'-UTR
106773	TCCTGTTTCTCCGGCAGAGG	4	0202-0221	AUG
106774	CATCCTGTTTCTCCGGCAGA	5	0204-0223	AUG
106775	GCCATCCTGTTTCTCCGGCA	6	0206-0225	AUG
106776	GGGCCATCCTGTTTCTCCGG	7	0208-0227	AUG
106777	TTGGGCCATCCTGTTTCTCC	8	0210-0229	AUG
106778	CATTGGGCCATCCTGTTTCT	9	0212-0231	AUG
106779	TCCATTGGGCCATCCTGTTT	10	0214-0233	AUG
106780	ATTCCATTGGGCCATCCTGT	11	0216-0235	AUG
106776	GGGCCATCCTGTTTCTCCGG	7	0208-0227	AUG
106777	TTGGGCCATCCTGTTTCTCC	8	0210-0229	AUG
106778	CATTGGGCCATCCTGTTTCT	9	0212-0231	AUG
106779	TCCATTGGGCCATCCTGTTT	10	0214-0233	AUG
106780	ATTCCATTGGGCCATCCTGT	11	0216-0235	AUG
106781	TGATTCCATTGGGCCATCCT	12	0218-0237	AUG
106782	GCTGATTCCATTGGGCCATC	13	0220-0239	AUG
106783	TAGCTGATTCCATTGGGCCA	14	0222-0241	AUG
106784	TGTAGCTGATTCCATTGGGC	15	0224-0243	Codificación

Secuencia de nucleótidos de fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos de STAT3 humanos (con brecha desoxi)				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' - > 3')	SEQ ID NO:	Coordenados de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
106785	CTGTAGAGCTGATGGAGCTG	16	0269-0288	Codificación
106786	CCCAATCTTGACTCTCAATC	17	0331-0350	Codificación
106787	CCCAGGAGATTATGAAACAC	18	0386-0405	Codificación
106788	ACATTCGACTCTTGACAGAA	19	0431-0450	Codificación
106789	TCTGAAGAACTGCTTGATT	20	0475-0494	Codificación
106790	GGCCACAATCCGGGCAATCT	21	0519-0538	Codificación
106791	TGGCTGCAGTCTGTAGAAGG	22	0562-0581	Codificación
106792	CTGCTCCAGCATCTGCTGCT	23	0639-0658	Codificación
106793	TTTCTGTTCTAGATCCTGCA	24	0684-0703	Codificación
106794	TAGTTGAAATCAAAGTCATC	25	0728-0747	Codificación
106795	TTCCATTCAGATCTTGATG	26	0772-0791	Codificación
106796	TCTGTTCCAGCTGCTGCATC	27	0817-0836	Codificación
106797	TCACTCACGATGCTTCTCCG	28	0860-0879	Codificación
106798	GAGTTTTCTGCACGTACTCC	29	0904-0923	Codificación
106799	ATCTGTTGCCGCTCTTCCA	30	0947-0968	Codificación
106800	CTAGCCGATCTAGGCAGATG	31	0991-1010	Codificación
106801	CGGGTCTGAAGTTGAGATTC	32	1034-1053	Codificación
106802	CGGCCGGTGCTGTACAATGG	33	1110-1129	Codificación
106803	TTTCATTAAGTTTCTGAACA	34	1155-1174	Codificación
106804	AGGATGCATGGGCATGCAGG	35	1200-1219	Codificación
106805	GACCAGCAACCTGACTTTAG	36	1260-1279	Codificación
106806	ATGCACACTTTAATTTTAAG	37	1304-1323	Codificación
106807	TTCCGGGATCCTCTGAGAGC	38	1349-1368	Codificación
106808	TTCCATGTTCACTTTTGG	39	1392-1411	Codificación
106809	GTCAAGTGTTTGAATTCTGC	40	1436-1455	Codificación
106810	CAATCAGGGAAGCATCACAA	41	1495-1514	Codificación
106811	TACACCTCGGTCTCAAAGGT	42	1538-1557	Codificación
106812	TGACAAGGAGTGGGTCTCTA	43	1581-1600	Codificación
106813	CGCCCAGGCATTTGGCATCT	44	1626-1645	Codificación
106814	CATTCTTGGGATTGTTGGTC	45	1669-1688	Codificación
106815	CACTTGGTCCCAGGTTCCAA	46	1713-1732	Codificación
106816	CCCGCTTGGTGGTGGACGAG	47	1756-1775	Codificación

Secuencia de nucleótidos de fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos de STAT3 humanos (con brecha desoxi)				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' - > 3')	SEQ ID NO:	Coordenados de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
106817	AGTTCACACCAGGCCCTAGG	48	1816-1835	Codificación
106818	GTTTTCTTTGCAGAAGTTAG	49	1860-1879	Codificación
106819	ATATTGTCTAGCCAGACCCA	50	1904-1923	Codificación
106820	AACCCATGATGTACCCTTCA	51	1963-1982	Codificación
106821	GCTTAGTGCTCAAGATGGCC	52	2005-2024	Codificación
106822	GCTGCTTTCACTGAAGCGCA	53	2043-2062	Codificación
106823	GTGAAAGTGACGCCTCCTTC	54	2066-2085	Codificación
106824	CTGATGTCCTTCTCCACCCA	55	2087-2106	Codificación
106825	ACTGGATCTGGGTCTTACCG	56	2107-2126	Codificación
106826	AAATGACATGTTGTTGAGCT	57	2151-2170	Codificación
106827	GCCCATGATGATTTGAGCAA	58	2169-2188	Codificación
106828	TATTGGTAGCATCCATGATC	59	2194-2213	Codificación
106829	ATAGACAAGTGGAGACAACA	60	2217-2236	Codificación
106830	TTGGGAATGTCAGGATAGAG	61	2237-2256	Codificación
106831	CTCCTGGCTCTCTGGCCGAC	62	2280-2299	Codificación
106832	ACCTGGGTCAGCTTCAGGAT	63	2301-2320	Codificación
106833	CACAGATAAACTTGGTCTTC	64	2338-2357	Codificación
106834	ATCGGCAGGTCAATGGTATT	65	2378-2397	Codificación
106835	CCAACTGCATCAATGAATC	66	2414-2433	Codificación
106836	GGTTCAGCACCTTCACCATT	67	2438-2457	Codificación
106837	GAGGGACTCAAAGTCCCTC	68	2466-2485	Codificación
106838	CAACTCCATGTCAAAGGTGA	69	2484-2503	Codificación
106839	TTCTCAGCTCCTCACATGGG	70	2525-2544	Detención
106840	CGTTCTCAGCTCCTCACATG	71	2527-2546	Detención
106841	TCCGTTCTCAGCTCCTCACA	72	2529-2548	Detención
106842	CTTCCGTTCTCAGCTCCTCA	73	2531-2550	Detención
106843	AGCTTCCGTTCTCAGCTCCT	74	2533-2552	Detención
106844	AGAATGCAGGTAGGCGCCTC	75	2569-2588	3'-UTR
106845	ACCACAAAGTTAGTAGTTTC	76	2623-2642	3'-UTR
106846	TGCTCAAAGATAGCAGAAGT	77	2665-2684	3'-UTR
106847	ATCACTCATTTCTCTATTT	78	2701-2720	3'-UTR
106848	CATTTAGATAAAAGCAGATC	79	2727-2746	3'-UTR

Secuencia de nucleótidos de fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos de STAT3 humanos (con brecha desoxi)				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' - > 3')	SEQ ID NO:	Coordenados de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
106849	ACATCCTTATTTGCATTTAG	80	2740-2759	3'-UTR
106850	GATCATGGGTCTCAGAGAAC	81	2760-2779	3'-UTR
¹ Los residuos resaltados 2'-metoxietoxi, residuos de 2'-metoxietoxi citosina y residuos 2'-OH citosina son 5-metil-citosinas; todos los enlaces son enlaces fosforotioato.				
² Coordenadas de GenBank® Accession No. L29277, nombre de locus "HUMAPRF", SEQ ID NO: 1.				

La actividad de los oligonucleótidos es probada por cuantificación de los niveles de ARNm de STAT3 por PCR en tiempo real utilizando el Sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM™ 7700 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este es un sistema de detección por fluorescencia no basado en gel en un tubo cerrado que permite una cuantificación de alto rendimiento de los productos de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real. En oposición al PCR estándar, en el cual los productos de la amplificación son cuantificados después de que se termina la PCR, los productos en PCR en tiempo real son cuantificados a medida que se acumulan. Esto se logra incluyendo en la reacción de PCR una sonda de oligonucleótido que se fusiona específicamente entre los cebadores de PCR delantero y reverso, y contiene dos colorantes fluorescentes. Un colorante informador (por ejemplo, JOE o FAM, PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) se une al extremo 5' de la sonda y un colorante de detención (por ejemplo, TAMRA o MGB, PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) se une al extremo 3' de la sonda. Cuando la sonda y los colorantes están intactos, la emisión del colorante informador es detenida por la proximidad del colorante de detención 3'. Durante la amplificación, la fusión de la sonda a la secuencia objetivo crea un sustrato que puede ser escindido por la actividad de la 5'-exonucleasa de la Taq polimerasa. Durante la fase de extensión del ciclo de amplificación de PCR, la escisión de la sonda por la Taq polimerasa libera el colorante informador del resto de la zona (y por lo tanto de la unidad estructural de detención) y se genera una señal fluorescente específica de la secuencia. Con cada ciclo, se escinden moléculas de colorante informador adicionales de sus respectivas sondas, y la intensidad de la fluorescencia se monitorea a intervalos regulares (6 segundos) mediante una óptica láser incorporada en el sistema de Detección de Secuencias ABI PRISM™ 7700. En cada ensayo, una serie de reacciones paralelas que contienen diluciones seriadas de ARNm de muestras de control no tratadas genera una curva estándar que se utiliza para cuantificar el porcentaje de inhibición después del tratamiento de oligonucleótido antisentido de las muestras de prueba.

El ARN aislado es sometido primero a una reacción de transcriptasa reversa para preparar ADN complementario (ADNc) a partir del ARN. El ADNc es el resultante del sustrato para PCR en tiempo real. Los reactivos de transcriptasa reversa y PCR en tiempo real son obtenidos de PE-Applied Biosystems, Foster City, CA. Las reacciones son llevadas a cabo agregando un coctel de PCR 25 1 (1xTAQMAN7 buffer A, 5.5 mM MgCl₂, 300 M de cada uno de dATP, dCTP y dGTP, 600 M dUTP, 100 nM de cada uno de cebador de inicio, cebador de retroceso y sonda, 20 U de inhibidor de seARN, 1.25 unidades de AMPLITAQ GOLD7, y 12.5 U de MuLV transcriptasa reversa) a placas de 96 pozos que contienen solución de ARNm poli (A) 25 1. La reacción de transcriptasa reversa se lleva a cabo por incubación durante 30 minutos a 48°C después de una incubación durante 10 minutos a 95°C para activar la AMPLITAQ GOLD7, se llevan a cabo 40 ciclos de un protocolo de PCR de dos etapas: 95°C durante 15 segundos (desnaturalización) seguidos por 60°C durante 1.5 minutos (fusión/extensión).

Los cebadores de PCR de STAT3 y la sonda pueden ser diseñados utilizando software comercial (por ejemplo oligo 5.0 o Primer Express®).

Ejemplo 3: Secuencias de oligonucleótidos de STAT3 de ratón

Los oligonucleótidos antisentido fueron diseñados para apuntar a STAT3 de ratón. Los datos de las secuencias objetivo son de la secuencia de ADNc de STAT3 enviados por Zhong, Z.; número de acceso GenBank® U06922, provisto aquí como SEQ ID NO: 82. Los oligonucleótidos fueron sintetizados con u oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con brecha") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región central de "brechas" consistente de diez 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en ambos lados (dirección 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleósido (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todas la citosinas 2'-MOE fueron 5-metil-citosinas. Las secuencias de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3. La línea celular de linfoma B, BCL1 fue obtenida de ATCC (Manassas, VA). Las células BCL1 fueron cultivadas bajo condiciones estándar en medio RPMI 1640.

Las células BCL1 (5 X 10⁶ células en PBS) fueron transfectadas con oligonucleótidos por electroporación, a 200V, 1000 F utilizando un BTX Electro Cell Manipulator™ 600 (Genetronics, San Diego, CA). Para una selección inicial,

las células BCL1 fueron sometidas a electroporación con oligonucleótido 10 M, y el ARN fue recolectado 24 horas después. Las muestras de control sin oligonucleótido fueron sometidas a las mismas condiciones de electroporación.

- 5 El ARN celular total fue aislado utilizando el kit RNEASY[®] (Qiagen, Santa Clarita, CA). Los experimentos de protección de seARN fueron llevados a cabo utilizando kits RIBOQUANT[™] y conjuntos de plantillas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pharmingen, San Diego, CA). La transferencia Northern fue llevada a cabo como lo describe Chiang, M-Y. et al. (J. Biol. Chem., 1991, 266, 18162-18171) utilizando una sonda de ADNc de rata preparada por la digestión con restricción Xho I/Sal I del plásmido psvsport-1 (ATCC, Rockville, MD). Los niveles de ARNm fueron cuantificados utilizando un PhosphorImager[™] (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

10

Tabla 3

Secuencias de nucleótidos de fosforotioato u oligodesoxinucleótidos quiméricos STAT3 de ratón (con brecha desoxi)				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' -> 3')	SEQ ID NO:	Coordenadas de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
17136	GTTCCACTGAGCCATCCTGC	83	0064-0083	AUG
17137	TTCAGGTAGCGTGTGCCAG	84	0096-0115	Codificación
17138	ATGTGACTCTTTGCTGGCTG	85	0205-0224	Codificación
17139	CCAAGAGATTATGAAACACC	86	0233-0252	Codificación
17140	GCTCCAACATCTGCTGCTTC	87	0485-0504	Codificación
17141	GCTCTTCATCAGTCAGTGTC	88	0767-0786	Codificación
17142	ATCTGACACCCTGAGTAGTT	89	1680-1699	Codificación
17143	GCCAGACCCAGAAGGAGAAG	90	1742-1761	Codificación
17144	CGCTCCTTGCTGATGAAACC	91	1827-1846	Codificación
17145	AACTTGGTCTTCAGGTACGG	92	2178-2197	Codificación
17146	ATCAATGAATCTAAAGTGCG	93	2253-2272	Codificación
17147	TCAGCACCTTCACCGTTATT	94	2283-2302	Codificación
17148	ACTCAAAGTGCCTCCTGCT	95	2309-2328	Codificación
17149	GGTTTCAGCTCCTCACATGG	96	2374-2393	Parada
17150	TAAAAAAAAAATCTGGAAC	97	2485-2504	3'-UTR
17151	AAGATAGCAGAAGTAGGAAA	98	2506-2525	3'-UTR
17152	AAAAAGTGCCAGATTGCCC	99	2527-2546	3'-UTR
17153	ATCACCCACACTCACTCATT	100	2557-2645	3'-UTR
17154	CCTTTGCCTCCCTTCTGCTC	101	2626-2645	3'-UTR
17155	TGAAAAGGAGGGCAGGCGG	102	2665-2684	3'-UTR
17156	CACCAGGAGGCACTTGTCTA	103	2705-2724	3'-UTR
17157	AACCTCCTGGGCTTAGTCCT	104	2822-2841	3'-UTR
23176	AAAAAGTGCGCAGATTGCCC	105	Control con 1 base no coincidente	
23177	AAAAAGTCCGCTGATTGCCC	106	Control con 3 bases no coincidentes	
23178	AAAAACTCCGCTGAATGCCC	107	Control con 5 bases no coincidentes	

Secuencias de nucleótidos de fosforotioato u oligodesoxinucleótidos quiméricos STAT3 de ratón (con brecha desoxi)				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' -> 3')	SEQ ID NO:	Coordenadas de nucleótidos de gen objetivo ²	Región de gen objetivo
¹ Todos los residuos citosina 2'-MOE son 5- metil-citosinas; todos los enlaces son enlaces fosforotioato.				
² Las coordenadas de GenBank® Accession No. U06922, nombre de locus "MMU06922", SEQ ID NO: 82.				

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Los oligonucleótidos 17138 (SEQ ID NO: 85), 17139 (SEQ ID NO: 86), 17140 (SEQ ID NO: 87), 17143 (SEQ ID NO: 90), 17144 (SEQ ID NO: 91), 17152 (SEQ ID NO: 99), 17153 (SEQ ID NO: 100), 17156 (SEQ ID NO: 103), y 17157 (SEQ ID NO: 104) dieron más de 45% de inhibición en este ensayo.

Tabla 4

Inhibición de la expresión de ARNm de STAT3 de ratón en células BCL1 por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos (con brecha desoxi)				
ISIS No:	SEQ ID NO:	Región objetivo en gen	% de expresión ARNm	% de inhibición ARNm
Control	---	---	100%	0%
17136	83	AUG	75%	25%
17137	84	Codificación	75%	25%
17138	85	Codificación	37%	63%
17139	86	Codificación	41%	59%
17140	87	Codificación	40%	60%
17141	88	Codificación	62%	38%
17142	89	Codificación	70%	30%
17143	90	Codificación	42%	58%
17144	91	Codificación	55%	45%
17145	92	Codificación	89%	11%
17146	93	Codificación	91%	9%
17147	94	Codificación	70%	30%
17148	95	Codificación	69%	31%
17149	96	Detención	70%	30%
17150	97	3'-UTR	95%	5%
17151	98	3'-UTR	92%	8%
17152	99	3'-UTR	25%	75%
17153	100	3'-UTR	44%	56%
17154	101	3'-UTR	80%	20%
17155	102	3'-UTR	78%	22%
17156	103	3'-UTR	40%	60%
17157	104	3'-UTR	53%	47%

- 5 **Ejemplo 4:** Respuesta a la dosis de fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos antisentido (con brecha desoxi) efectos sobre niveles de proteína de STAT3 de ratón en células BCL1

Se escogió ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) para estudios posteriores. El efecto de este oligonucleótido sobre los niveles de proteína se determinó por transferencia Western. La ISIS 23177 (SEQ ID NO: 106), una no coincidencia de 3 bases, se utilizó como control. Las células BCL1 fueron cultivadas, tratadas y procesadas esencialmente como se describió en el ejemplo 3.

- 5 Los extractos nucleares fueron preparados como para las células B primarias y las líneas celulares de linfoma B como lo describe Karras, J.G., et al. (J. Exp. Med., 1997, 185, 1035-1042).

La transferencia Western fue llevada a cabo como lo describe Karras, J.G. et al. (J. Immunol., 1996, 157, 2299). Los anticuerpos STAT1 y STAT3 fueron obtenidos de UBI (Lake Placid, NY).

- 10 Los resultados se muestran en la Tabla 5. La ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) redujo significativamente los niveles de proteína de STAT3 en comparación con un control no coincidente.

Tabla 5

Respuesta a dosis de células BCL1 a fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos de STAT3 (con brecha desoxi)					
ISIS #	SEQ ID NO:	Objetivo gen ASO	Dosis	% de expresión proteína	% inhibición proteína
Control	---	---	---	100%	---
17152	99	3'-UTR	10 nM	41.7%	58.3%
"	"	"	15 nM	42.5%	57.5%
"	"	"	20 nM	26.5%	73.5%
23177	106	Control	10 nM	75.1%	24.9%
"	"	"	15 nM	67.6%	32.4%
"	"	"	20 nM	62.6%	37.4%

Ejemplo 5: Inhibición de proliferación de BCL1 por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos antisentido de STAT3 (con brecha desoxi)

- 15 Se determinó el efecto de ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) sobre la proliferación de BCL1. Las células BCL1 contienen STAT3 activo constitutivamente el cual se cree es responsable de su proliferación. Las células BCL1 (1×10^5) fueron sometidas a electroporación esencialmente como se describe en el ejemplo 3 con 10 nM, 15 nM o 20 nM de STAT3 (ISIS 17152) u oligonucleótido no coincidente (ISIS 23177). Las células fueron incubadas en placas de 96 pozos en RPMI completo 200 L durante 48 horas después de la electroporación. Los cultivos fueron pulsados con 1 Ci de [^3H]-timidina durante las 8 horas finales en cultivo. Las células fueron recolectadas y analizadas en cuanto a la incorporación de timidina como se describe en Francis, D.A. et al. (Int. Immunol., 1995, 7, 151-161).
- 20

Los resultados se muestran en la Tabla 6. ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) redujo la proliferación de células BCL1 en aproximadamente 50%, mientras que el control no coincidente no tuvo efectos sobre la proliferación celular.

Tabla 6

Inhibición de la proliferación de células BCL1 con fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos de STAT3 (con brecha desoxi)					
ISIS #	SEQ ID NO:	Objetivo gen ASO	Dosis	% proliferación celular	% inhibición celular
Control	---	---	---	100%	---
17152	99	3'-UTR	10 nM	78.5%	21.5%
"	"	"	15 nM	54.4%	45.6%
"	"	"	20 nM	50.2%	49.8%
23177	106	Control	10 nM	117.0%	---
"	"	"	15 nM	99.7%	0.3%

Inhibición de la proliferación de células BCL1 con fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos de STAT3 (con brecha desoxi)					
ISIS #	SEQ ID NO:	Objetivo gen ASO	Dosis	% proliferación celular	% inhibición celular
"	"	"	20 nM	107.0%	---

Ejemplo 6: Inhibición de la secreción de IgM de BCL1 por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos antisentido de STAT3 (con brecha de desoxi)

Se determinó el efecto de ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) sobre los niveles de secreción de IgM en células BCL1. La STAT3 ha sido implicada en la regulación de la expresión de IgM (Faris, M., et al., Immunology, 1997, 90, 350-357). Las células BCL1 (1×10^6) fueron sometidas a electroporación como se describió esencialmente en el ejemplo 3 con 5 nm o 15 nm de STAT3 (ISIS 17152) u oligonucleótido no coincidente (ISIS 23177). Las células fueron incubadas en placas de 12 pozos en 2 mL de RPMI completo después de la electroporación. El medio fue reemplazado con medio fresco 24 horas después de la electroporación. Después de 48 horas adicionales, el medio de cultivo fue recolectado, centrifugado para eliminar las células y probado en cuanto al contenido de IgM utilizando el kit OPT-EIA™ ELISA (Pharmingen, San Diego, CA) para capturar y detectar los anticuerpo IgM de ratón (Southern Biotechnology, Birmingham, AL).

Los resultados se muestran en la Tabla 7. La ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) redujo significativamente la secreción de IgM en comparación el oligonucleótido de control no coincidente (ISIS 23177).

Tabla 7

Inhibición de la secreción de IgM en BCL1 por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos de STAT3 (con brecha desoxi)					
ISIS #	SEQ ID NO:	Objetivo gen ASO	Dosis	% de expresión IgM	% inhibición IgM
Control	---	---	---	100%	---
17152	99	3'-UTC	5 nM	34.2%	65.8%
"	"	"	15 nM	23.1%	76.9%
23177	106	Control	5 nM	110.0%	---
"	"	"	15 nM	80.8%	19.2%

Ejemplo 7: Inducción de quimioquinas en células BCL1 después de tratamiento con fosforotioato nucleótidos quiméricos antisentido de STAT3 (con brecha desoxi)

Se determinó el efecto de ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) sobre los niveles de quimioquina en células BCL1. Las células BCL1 fueron sometidas a electroporación esencialmente como se describe en el ejemplo 3 con 5 nm, 10 nm o 20 nm de STAT3 (ISIS 17152) u oligonucleótido no coincidente (ISIS 23177). La expresión del gen de quimioquina fue inducida en las células BCL1 sometidas a electroporación mediante la adición de 10 uM de un oligonucleótido que contenía CpG al medio 16 horas después de la electroporación. Los oligonucleótidos que contenían CpG son moléculas inmunoestimuladoras (Krieg, A.M., et al., Nature, 1995, 374, 546-549). Los niveles de quimioquina fueron medidos 8 horas después de utilizar el ensayo de protección de RNasa por métodos conocidos para los experimentados en la técnica con un conjunto de plantilla de quimioquina de ratón, Mck-5 (Pharmingen, San Diego, CA).

Los resultados se muestran en la Tabla 8. La ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) fue capaz de inducir la expresión de las quimioquinas RANTES, MIP-1-alfa y MIP-1-beta mientras que el control no coincidente tuvo efecto mínimo.

Tabla 8

Inducción de quimioquinas en células BCL1 después de tratamiento con fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos de STAT3 (con brecha desoxi)						
ISIS #	SEQ ID NO:	Objetivo gen ASO	Dosis	% RANTES ARNm	% MIP1a ARNm	% MIP1b ARNm
Control	---	---	---	100%	100%	100%
17152	99	3'-UTR	5 nM	236%	201%	133%

"	"		10 nM	266%	258%	150%
"	"		20 nM	257%	254%	159%
23178	107	Control	5 nM	96%	123%	96.5%
"	"	"	10 nM	70.2%	116%	87.1%
"	"	"	20 nM	56%	106%	73.3%

Ejemplo 8: Oligonucleótidos antisentido adicionales direccionados a STAT3 humana

Un conjunto adicional de oligonucleótidos direccionados a SEQ ID NO: 1 fue diseñado y sintetizado con u oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con brecha") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región "brecha" central consistente de diez 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos (mostrados resaltados). Los enlaces internucleósido (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todas las citocinas 2'-MOE y citosina 2'-desoxi son 5-metilo citosinas. Estas secuencias de oligonucleótidos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

Secuencias de nucleótidos de fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos adicionales (con brecha desoxi) direccionados a STAT3 humana					
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5' - > 3')	Coordenadas de nucleótidos de gen objetivo ²	Región objetivo en gen	SEQ NO:	ID
113169	ATGTG ATTCTTTGCT GGCCG	357	5' UTR	108	
113170	AGCTG ATTCCATTGG GCCAT	221	AUG	109	
113171	CCAGG AGATTATGAA ACACC	385	Codificación	110	
113172	ACCGT GTGTCAAGCT GCTGT	241	Codificación	111	
113173	CCATT GGGAAGCTGT CACTG	286	Codificación	112	
113174	TGTGA TTCTTTGCT GGCCG C	356	Codificación	113	
113175	GCGG CTATACTGCT GGTCAA	411	Codificación	114	
113176	GCTCC AGCATCTGCT GCTTC	637	Codificación	115	
113177	GATTCT TTCCACAGG CACCG	539	Codificación	116	
113178	TGATTCT TTCCACAGG CACC	540	Codificación	117	
113179	ATCCT GAAGGTGCT GCTCCA	651	Codificación	118	
113180	CGGAC ATCCTGAAGGT GCTG	656	Codificación	119	
113181	CCCGC CAGCTCACT CACGAT	869	Codificación	120	
113182	AGTCAG CCAGCTCCT CGTCC	928	Codificación	121	
113183	CCAGTC AGCCAGCTCCT CGT	930	Codificación	122	
113184	CGCCT CTTCCAGTCAG CCAG	938	Codificación	123	
113185	GGCCG GTGCTGTACA ATGGG	1109	Codificación	124	
113186	ATCCTCT CCTCCAGCAT CGG	1127	Codificación	125	
113187	CCGCT CCACCACAA AGGCAC	1176	Codificación	126	
113188	CGTCCC CAGAGTCTTT GTCA	1324	Codificación	127	

Secuencias de nucleótidos de fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos adicionales (con brecha desoxi) direccionados a STAT3 humana				
ISIS NO.	Secuencia de nucleótidos ¹ (5'- > 3')	Coordenadas de nucleótidos de gen objetivo ²	Región objetivo en gen	SEQ ID NO:
113189	TTGTGTTTGTGCCAGAATG	1375	Codificación	128
113190	GCTCGGCCCCATTCCACA	1472	Codificación	129
113191	AGGCATTTGGCATCTGACAG	1621	Codificación	130
113192	CTTGGGATTGTTGGTCAGCA	1665	Codificación	131
113193	CTCGGCCACTTGGTCCCAGG	1719	Codificación	132
113194	CCCCGCTTGGTGGTGGACGA	1757	Codificación	133
113195	CCCCCGCTTGGTGGTGGACG	1758	Codificación	134
113196	GGAGAAGCCCTTGCCAGCCA	1881	Codificación	135
113197	TTCATTCCAAAGGGCCAAGA	1947	Codificación	136
113198	CCCGCTCCTTGCTGATGAAA	1981	Codificación	137
113199	GTGCTCAAGATGGCCCGCTC	2000	Codificación	138
113200	CCCAAGTGAAAGTGACGCCT	2071	Codificación	139
113201	ACCCAAGTGAAAGTGACGCC	2072	Codificación	140
113202	CCGAATGCCTCCTCCTTGGG	2252	Codificación	141
113203	GCCGACAATACTTCCCGAAT	2266	Codificación	142
113204	GATGCTCCTGGCTCTCTGGC	2284	Codificación	143
113205	TCAATGAATCTAAAGCGCGG	2404	Codificación	144
113206	GACTCAAAGTGCCCTCCTGC	2462	Codificación	145
113207	ATCACCCACATTCACTCATT	2710	3' UTR	146
113208	AAAAGTGCCCAGATTGC	2682	3' UTR	147
113209	AAAAGTGCCCAGATTGCTCA	2679	3' UTR	148
113210	TAAAAGTGCCCAGATTGCTC	2680	3' UTR	149
113211	AAGCAGATCACCCACATTCA	2716	3' UTR	150

Estos oligonucleótidos fueron probados en células U266 acerca de su capacidad para reducir la expresión de STAT3 en una concentración de oligonucleótido de 2.5 μ M. Las líneas celulares de mieloma humano U266 (obtenidas originalmente de American Type Culture Collection) fueron mantenidas bajo condiciones estándar en medio RPMI 1640 suplementado. Las células (15×10^6 células en PBS) fueron transfectadas con oligonucleótidos a 200V con un pulso individual de 6 milisegundos utilizando un BTX Electro Square Porator T820 (Genetronics, San Diego CA). Las células fueron incubadas durante 24 horas antes de la extracción de ARN.

El ARN celular total fue aislado utilizando el kit RNeasy® (Qiagen, Santa Clarita, CA). El análisis por transferencia Northern fue llevado a cabo sobre 15 μ g de ARN utilizando una sonda de ADNc preparada a partir de ARN MB-MDA 468 por RT-PCR estándar seguido por una reacción de cebador anidado. Las señales fueron cuantificadas utilizando un Molecular Dynamics Phosphorimager™.

Los resultados para compuestos seleccionados (expresados como porcentaje de expresión de ARNm de control y porcentaje de inhibición de la expresión de ARNm) se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

Inhibición de la expresión de ARNm de STAT3 humana en células U266 por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos (con brecha desoxi)				
ISIS No:	SEQ ID NO:	Región objetivo en gen	% expresión de ARNm	% inhibición ARNm
Ninguno	---	---	100	---
17148	95	Codificación	95.1	4.9
17152	99	3' UTR	82.5	17.5
113170	109	AUG	89.6	10.4
113171	110	Codificación	110.2	---
113172	111	Codificación	96.1	3.9
113173	112	Codificación	119	---
113175	114	Codificación	75.8	24.2
113176	115	Codificación	72.3	27.7
113178	117	Codificación	143.9	---
113181	120	Codificación	105.4	---
113184	123	Codificación	104.3	---
113187	126	Codificación	55.9	44.1
113189	128	Codificación	163.9	---
113199	139	Codificación	64.4	35.6
113207	146	3' UTR	123.6	---
113209	148	3' UTR	71.4	28.6
113210	149	3' UTR	72.2	27.8
113211	150	3' UTR	116.5	---

Los experimentos de respuesta a la dosis fueron llevados a cabo utilizando ISIS 113176, 129987, 113187, 129991, 113209, 129995, 113210 y 129999 así como ISIS 17148 y el oligo ISIS 114054 de STAT3 de ratón. Como controles se uso una serie de oligonucleótidos no coincidentes ISIS 129987, ISIS 114505, ISIS 129991, ISIS 129995 y ISIS 129999. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

5

Tabla 11

Porcentaje de inhibición de la expresión de ARNm de STAT3 humana con oligonucleótidos antisentido-respuesta a la dosis				
		Porcentaje de inhibición de la expresión de STAT3		
ISIS #	SEQ ID NO:	Concentración de oligo		
		2.5 μ M	5 μ M	10 μ M
17148	95	8	54	60
114054	403	4	17	15
113176	115	33	67	79
129987	404	5	5	29

113187	126	44	56	75
129991	405	21	22	26
113209	148	43	54	73
129995	406	5	32	25
113210	149	36	50	76
129999	407	31	8	---

ISIS 17148 (SEQ ID 95), 113176 (SEQ ID 115), 113187 (SEQ ID 126), 113209 (SEQ ID 148) y 113210 (SEQ ID 149) redujeron la expresión de STAT3 en más del 50% en una o más concentraciones de oligonucleótidos. Estos compuestos son por lo tanto preferidos.

Ejemplo 9: La inhibición antisentido de STAT3 produce muerte apoptótica celular en células de melanoma de ratón

- 5 Se cultivaron células de melanoma de ratón B16 bajo condiciones estándar en medio RPMI 1640 suplementado (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY).

Las células fueron tratadas con ISIS 17152 (SEQ ID: 99), direccionadas a STAT3 de ratón, o con el control no coincidente de 3 bases, ISIS 28084 (AAAAAGAGGCCTGATTGCCC; SEQ ID NO: 151). Las células fueron transfectadas con oligonucleótidos utilizando el reactivo LipofectAMINE™ PLUSJ (GibcoBRL). El oligonucleótido fue precomplejado con LipofectAMINE™ PLUSJ mezclando el oligonucleótido con 100 ul de medio RPMI 1640 libre de suero, y subsecuentemente agregando 6 ul del reactivo LipofectAMINE™ PLUS.

La mezcla fue mezclada exhaustivamente e incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se diluyeron 4 ul adicionales del reactivo LipofectAMINE™ PLUSJ a 100 ul en RPMI libre de suero. Esta LipofectAMINE™ PLUSJ diluida fue mezclada con la mezcla precomplejada de oligonucleótido/ LipofectAMINE™ PLUSJ incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 800 l de RPMI 1640 libre de suero y la mezcla de oligonucleótido-medio LipofectAMINE™ PLUSJ resultante (aproximadamente 1 ml) fue agregada a las células en una placa de 6 pozos. Después de 3 horas de incubación, se agregó 1 ml de RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 20%. Las concentraciones finales de oligonucleótidos fueron 200 nM o 300 nM.

Las células fueron contadas 24 horas después de la transfección para determinar el efecto del tratamiento antisentido sobre la viabilidad celular. Las células fueron recolectadas 24 horas después de la transfección para análisis por transferencia Western, y 48 horas después de la transfección para tinción con Annexin-V para la apoptosis. Los efectos del oligonucleótido sobre el número de células se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

Efecto de inhibición antisentido de STAT3 sobre el número de células					
Expt	200 nM			300 nM	
	ISIS 28084 (3 no coincidencias)	ISIS 17152		ISIS 28084 (3 no coincidencias)	ISIS 17152
1	10.2 x 10 ⁵	3.8 x 10 ⁵			
2	5.0 x 10 ⁵	6.8 x 10 ⁵		9.1 x 10 ⁵	3.5 x 10 ⁵
3	3.5 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁵		3.3 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁵

Los datos muestran que el tratamiento con el oligonucleótido antisentido de STAT3 da como resultado una muerte celular incrementada en comparación con el tratamiento con un oligo de control no coincidente.

La apoptosis en las células B16 fue medida 48 horas después del tratamiento antisentido por tinción con Annexin V-PE (Clontech, Palo Alto, CA), seguido por análisis de citometría de flujo. La tinción positiva para Annexin-V es un indicador de apoptosis. Las células transfectadas Mock y tratadas con el oligonucleótido de control tenían 11% y 10% de células positivas a Annexin-V, respectivamente. En contraste, las células tratadas con ISIS 17152 al 30% fueron positivas a Annexin-V, indicando un incremento de casi tres veces en el número de células apoptóticas. Debe anotarse que este incremento aparente es probablemente una subestimación del número de células que experimentaron apoptosis en respuesta al tratamiento con el oligo STAT3 puesto que se eliminan células muertas en el procesamiento de las células en el ensayo de apoptosis.

El análisis por transferencia Western fue llevado a cabo para detectar STAT3 utilizando métodos conocidos para los experimentados en la técnica sobre células recolectadas 24 horas después del tratamiento antisentido. El anticuerpo antiSTAT3 fue adquirido de K15, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. La ISIS 17152 a 200 nM o 300 nM redujo significativamente la producción de proteína STAT3 en células B16.

5 **Ejemplo 10:** Efecto de oligonucleótidos antisentido de STAT3 en linfocitos granulares grandes leucémicos (LGL)

La leucemia LGL es una enfermedad linfoproliferativa con características autoinmunes y se conoce que las células LGL no sufren apoptosis dependiente de Fas, independientemente de los altos niveles de expresión de Fas y FasL (Lamy et al., Blood, 1998, 92, 4771-7). Los oligonucleótidos antisentido de STAT3 fueron probados en cuanto a su capacidad para sensibilizar las células LGL a las señales apoptóticas en estas células.

- 10 Las células leucémica LGL fueron obtenidas de pacientes que satisficieron los criterios clínicos de leucemia LGL de células T (CD3+) con recuentos de LGL incrementados y reordenamientos genéticos TCR clónales. Todos los pacientes tenían enfermedad crónica que no requería tratamiento en el momento del análisis. Las células LGL leucémicas purificadas (2×10^6) fueron sembradas en placas de 24 pozos en 0.5mL de medio completo (RPMI-1640 suplementado, de Gibco Life Technologies, Gaithersburg, MD). Las células fueron incubadas bien sea con oligonucleótido antisentido ISIS 17148 (SEQ ID NO: 95) o el oligonucleótido de control, ISIS 16094 (SEQ ID NO: 152). El oligonucleótido antisentido fue suministrado a células leucémicas LGL por consumo pasivo. No se utilizaron reactivos de transfección para la administración.

- 20 Los extractos fueron preparados a partir de las células LGL cada una de tres pacientes tratados con una dosis de 1 uM de oligonucleótidos antisentido de STAT3 (ISIS 17148, SEQ ID: 95) o de control no coincidente. Las inmunoprecipitaciones Western fueron ejecutadas para determinar los niveles de proteína de STAT3. Una reducción en los niveles de proteína de STAT3 vario de 25 a 45% en comparación con controles pareados tratados con el oligo no coincidente.

- 25 La inducción de apoptosis en células LGL tratadas con oligonucleótidos antisentido de STAT3 (ISIS 17148, SEQ ID: 95) o de control no coincidentes en dosis de 1, 2 y 5 uM fue medida por citometría de flujo. La apoptosis se incremento significativamente en las células tratadas con antisentido de STAT 3 y fue independiente de la dosis. Las mediciones del porcentaje de apoptosis específicas en reacciones en duplicado revelaron un incremento en la apoptosis desde aproximadamente 5% en células no tratadas a niveles de 6, 17 y 24% en células tratadas con STAT3 antisentido a 1, 2 y 5uM respectivamente. Los niveles de apoptosis en células tratadas con oligonucleótido de control permanecieron a aproximadamente 6% en todas las dosis. Se cree que la apoptosis fue activada a través de una ruta mediada por Fas.

30 **Ejemplo 11**

Inducción de apoptosis en la línea celular U266 de mieloma humano después de tratamiento con oligonucleótido antisentido de STAT3

- 35 El mieloma múltiple (MM) es un trastorno hiperproliferativo. Estudios previos demuestran un incremento en la apoptosis en una línea celular U266 MM en respuesta a la expresión de un STAT3 negativo dominante que carece de un dominio de transactivación intacto.

- 40 Los oligonucleótidos STAT3 antisentido ISIS 17148 (SEQ ID NO: 95) e ISIS 113176 (SEQ ID: 115) fueron probados en cuanto a su capacidad para incrementar la apoptosis en células U266 en comparación con un oligonucleótido de control no coincidente. Cantidades diversas de oligonucleótido fueron administradas a células cultivadas por transfección. Las células fueron recolectadas 48 horas después de la transfección para determinar los niveles de ARNm y proteína de STAT3 por transferencia Northern y Western, respectivamente. Una reducción en el ARNm y proteínas de STAT3 significativa dependiente de la dosis fue observada en respuesta a la administración de ambos oligonucleótidos antisentido de STAT3. El oligonucleótido de control no coincidente no tuvo efecto significativo sobre los niveles de ARNm o proteína de STAT3.

- 45 Las células también fueron probadas en cuanto a un incremento en la apoptosis en respuesta a los oligonucleótidos antisentido de STAT3 por tinción con Annexin 5 y citometría de flujo como se describió anteriormente.

Un incremento significativo en la apoptosis fue observada en las células transfectadas tanto con ISIS 17148 como con ISIS 113176. No se observo un cambio significativo en apoptosis en las células tratadas con el oligonucleótido de control no coincidente.

50 **Ejemplo 12**

Inhibición antisentido de STAT3 humano por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y una brecha desoxi

De acuerdo con la presente invención, una serie adicional de oligonucleótidos fue diseñada para direccionar a diferentes regiones de la STAT3 humana, utilizando secuencias publicadas (número de acceso GenBank® L29277,

- incorporada aquí como SEQ ID NO: 1, el complemento de los nucleótidos 4189213 a 4263636 de la secuencia con el número de acceso GenBank® NT_010755.13, incorporada aquí como SEQ ID NO: 153 y el número de acceso GenBank® NM_139276.1, incorporado aquí como SEQ ID NO: 154). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 13. El "sitio objetivo" indica el primer número de nucleótido (el más hacia 5') sobre la secuencia objetivo particular a la cual se enlaza el oligonucleótido. Todos los compuestos en la Tabla 13 son oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con brecha") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región de "brecha" central consistente de diez 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.
- Los compuestos fueron analizados en cuanto a su efecto sobre los niveles de ARNm de STAT3 en células A549. La línea celular A549 de carcinoma pulmonar humano fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Las células A549 fueron cultivadas de manera rutinaria en medio basal de DMEM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células fueron pasadas de manera rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia.
- La ISIS 18078 fue utilizada con un oligonucleótido de control y fue utilizada a 75 nM. La ISIS 18078 (GTGCGCGAGCCCCGAAATC, SEQ ID NO: 155) es un oligonucleótido quimérico ("oligómeros con brecha") de 20 nucleótidos de longitud, compuesto de una región central "de brecha" consistente de nueve 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos y seis nucleótidos, respectivamente. Las alas están compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleósidos (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.
- Cuando las células alcanzaron 65 - 75% de confluencia, fueron tratadas con el oligonucleótido. Para células cultivadas en placas de 96 pozos, los pozos fueron lavados una vez con 100 µL de medio de suero reducido OPTI-MEM-1™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) y luego tratadas con 130 µL de OPTI-MEM-1™ que contenía 3.75 g/mL de LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) y 75 nM de los compuestos de la Tabla 13. Las células fueron tratadas y los datos fueron obtenidos en duplicado. Células no tratadas sirvieron como controles. Después de 4 - 7 horas del tratamiento a 37°C, el medio fue reemplazado con medio fresco. Las células fueron recolectadas 16 - 24 horas después del tratamiento con el oligonucleótido. Los niveles de ARNm de STAT3 en las células A549 fueron cuantificados por PSR en tiempo real como se describió por otros métodos aquí.
- Las sondas y cebadores para STAT3 humana fueron diseñadas para hibridar a una secuencia de STAT3 humana, utilizando información de secuencia publicada (incorporada aquí como SEQ ID NO: 1). Para el conjunto 199 de sonda de cebador (PPS199) los cebadores de PCR fueron: cebador de avance: ACATGCCACTTTGGTGTTTCATAA (SEQ ID NO: 156) cebador reverso: TCTTCGTAGATTGTGCTGATAGAGAAC (SEQ ID NO: 157) y la sonda de PCR fue: FAM-CAGTATAGCCGCTTCCTGCAAGAGTCGAA-TAMRA (SEQ ID NO: 158) donde FAM es el colorante informador fluorescente y TAMRA es el colorante de detención. Las cantidades objetivo de gen obtenidas por RT-PCR en tiempo real son normalizadas cuantificando el ARN total usando RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). En esta prueba, 170 µL de reactivo de trabajo RiboGreen™ (reactivo RiboGreen™ diluido 1:350 en Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5 10 mM) se pipetea en una placa de 96 pozos que contiene 30 µL de ARN celular purificado. La placa es leída en un CitoFluor® 4000 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm.
- Los resultados de los tratamientos con oligonucleótidos antisentido son el promedio de 2 experimentos y se muestran en la Tabla 13. Los datos están expresados como porcentaje de inhibición con respecto a las células de control no tratadas.

Tabla 13

Inhibición de niveles de ARNm de STAT3 humana por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'MOE con una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
337245	intrón	153	6814	AGCCTCTGCACCCTCATGTT	77	159
337246	intrón	153	6868	CTCCTAAATTAAGAACTTCT	37	160
337247	intrón	153	14801	TTTTGCATGATGTAACCACT	87	161
337248	intrón	153	34820	TATTGAAAATTATCTAATTC	0	162
337249	Codificación	153	40369	TTGGGCCATCCTGCTAAAAT	48	163

Inhibición de niveles de ARNm de STAT3 humana por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2' MOE con una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
337250	exón:intró	153	50156	ATTCACCTTGCCCTCCTTGACT	51	164
337251	intrón:exón	153	51124	ATGCCCTTACTCTCCGCATC	74	165
337252	exón:intrón	153	59140	CTGAACTTACCCTCTGAGAG	60	166
337253	exón:intrón	153	64176	AAATGCGGACCCAAGAGTTT	49	167
337254	5'UTR	1	56	CTTGTTCCCTCGGCTGCGAC	57	168
337255	5'UTR	1	79	GCCTGTCCAGGATCCGGTTG	75	169
337256	5'UTR	1	126	GAAGGGCCTCTCCGAGCCGA	67	170
337257	5'UTR	1	148	GCGGCGAGGCTCCCTCAGG	80	171
337258	5'UTR	1	193	TCCGGCAGAGGCCGAGAGGC	56	172
337259	5'UTR	154	225	CCATCCTGCTAAAATCAGGG	58	173
337260	5'UTR	154	233	CCATTGGGCCATCCTGCTAA	62	174
337261	Codificación	1	235	TGTCAAGCTGCTGTAGCTGA	79	175
337262	Codificación	1	299	AACTGCCGCAGCTCCATTGG	74	176
337263	Codificación	1	326	TCTTGACTCTCAATCCAAGG	79	177
337264	Codificación	1	339	CGCATATGCCCAATCTTGAC	81	178
337265	Codificación	1	426	CGACTCTTGCAGGAAGCGGC	92	179
337266	Codificación	1	453	TCGTAGATTGTGCTGATAGA	61	180
337267	Codificación	1	470	AGAAACTGCTTGATTCTTCG	62	181
337268	Codificación	1	484	GATACCTGCTCTGAAGAAAC	75	182
337269	Codificación	1	491	TTCTCAAGATACCTGCTCTG	74	183
337270	Codificación	1	496	TTGGCTTCTCAAGATACCTG	89	184
337271	Codificación	1	541	GTGATTCTTCCCACAGGCAC	85	185
337272	Codificación	1	629	ATCTGCTGCTTCTCCGTCAC	74	186
337273	Codificación	1	634	CCAGCATCTGCTGCTTCTCC	73	187
337274	Codificación	1	647	TGAAGGTGCTGCTCCAGCAT	74	188
337275	Codificación	1	683	TTCTGTTCTAGATCCTGCAC	82	189
337276	Codificación	1	708	CTGGAGATTCTCTACCACTT	91	190
337277	Codificación	1	716	AAGTCATCCTGGAGATTCTC	79	191
337278	Codificación	1	721	AATCAAAGTCATCCTGGAGA	69	192
337279	Codificación	1	726	GTTGAAATCAAAGTCATCCT	78	193
337280	Codificación	1	731	TTATAGTTGAAATCAAAGTC	45	194
337281	Codificación	1	736	GGGTTTTATAGTTGAAATCA	16	195

Inhibición de niveles de ARNm de STAT3 humana por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2' MOE con una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
337282	Codificación	1	741	CTTGAGGGTTTTATAGTTGA	58	196
337283	Codificación	1	746	TGACTCTTGAGGGTTTTATA	71	197
337284	Codificación	1	751	CTCCTTGACTCTTGAGGGTT	91	198
337285	Codificación	1	756	CATGTCTCCTTGACTCTTGA	78	199
337286	Codificación	1	768	ATTCAGATCTTGCATGTCTC	77	200
337287	Codificación	1	779	TGGTTGTTTCCATTCAGATC	82	201
337288	Codificación	1	790	TGGTCACTGACTGGTTGTTT	84	202
337289	Codificación	1	812	TCCAGCTGCTGCATCTTCTG	83	203
337290	Codificación	1	822	GAGCATCTGTTCCAGCTGCT	80	204
337291	Codificación	1	848	CTTCTCCGCATCTGGTCCAG	66	205
337292	Codificación	1	899	TTCTGCACGTACTCCATCGC	81	206
337293	Codificación	1	925	CAGCCAGCTCCTCGTCCGTG	92	207
337294	Codificación	1	935	CTCTTCCAGTCAGCCAGCTC	75	208
337295	Codificación	1	941	TGCCGCCTCTTCCAGTCAGC	82	209
337296	Codificación	1	999	CCAGTTTTCTAGCCGATCTA	80	210
337297	Codificación	1	1006	ACGTTATCCAGTTTTCTAGC	72	211
337298	Codificación	1	1025	AGTTGAGATTCTGCTAATGA	74	212
337299	Codificación	1	1030	TCTGAAGTTGAGATTCTGCT	80	213
337300	Codificación	1	1085	CCTTTGTAGGAACTTTTTTG	23	214
337301	Codificación	1	1162	AGGCACTTTTCATTAAGTTT	73	215
337302	Codificación	1	1262	TTGACCAGCAACCTGACTTT	61	216
337303	Codificación	1	1286	AGCTGATAATTCAACTCAGG	85	217
337304	Codificación	1	1291	TTTTAAGCTGATAATTCAAC	15	218
337305	Codificación	1	1297	CTTTAATTTTAAGCTGATAA	25	219
337306	Codificación	1	1302	GCACACTTTAATTTTAAGCT	77	220
337307	Codificación	1	1307	TCAATGCACACTTTAATTTT	53	221
337308	Codificación	1	1364	CCCAGAATGTTAAATTTCCG	70	222
337309	Codificación	1	1414	AGAGGCTGCCGTTGTTGGAT	73	223
337310	Codificación	1	1433	AAGTGTTTGAATTCTGCAGA	73	224
337311	Codificación	1	1452	TCTCTGCTCCCTCAGGGTCA	61	225
337312	Codificación	1	1517	ATCAGGTGCAGCTCCTCAGT	78	226
337313	Codificación	1	1522	AGGTGATCAGGTGCAGCTCC	61	227

ES 2 521 599 T3

Inhibición de niveles de ARNm de STAT3 humana por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2' MOE con una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
337314	Codificación	1	1527	CTCAAAGGTGATCAGGTGCA	75	228
337315	Codificación	154	1571	GAGGCCTTGATGATACACCT	46	229
337316	Codificación	154	1579	TCAATCTTGAGGCCTTGCTG	59	230
337317	Codificación	154	1584	CTAGGTCAATCTTGAGGCCT	55	231
337318	Codificación	1	1569	GGTCTCTAGGTCAATCTTGA	74	232
337319	Codificación	1	1577	AAGGAGTGGGTCTCTAGGTC	38	233
337320	Codificación	154	1602	CTGGCAAGGAGTGGGTCTCT	74	234
337321	Codificación	154	1609	ACCACAACTGGCAAGGAGTG	80	235
337322	Codificación	1	1609	TCTGACAGATGTTGGAGATC	69	236
337323	Codificación	1	1614	TGGCATCTGACAGATGTTGG	79	237
337324	Codificación	1	1619	GCATTTGGCATCTGACAGAT	79	238
337325	Codificación	1	1667	TTCTTGGGATTGTTGGTCAG	75	239
337326	Codificación	1	1778	GTCAGCTGCTCGATGCTCAG	78	240
337327	Codificación	154	1823	TCCAAGAGTTTCTCTGCCA	84	241
337328	Codificación	1	1838	CATGTGATCTGACACCCTGA	85	242
337329	Codificación	1	1843	TAGCCCATGTGATCTGACAC	88	243
337330	Codificación	154	1885	GCCATGTTTTCTTTGCAAAA	59	244
337331	Codificación	1	1873	CCTTGCCAGCCATGTTTTCT	88	245
337332	Codificación	1	1878	GAAGCCCTTGCCAGCCATGT	91	246
337333	Codificación	154	1903	AAGGAGAAGCCCTTGCCAGC	90	247
337334	Codificación	154	1908	CCCAGAAGGAGAAGCCCTTG	85	248
337335	Codificación	154	1918	TCCAGCCAGACCCAGAAGGA	86	249
337336	Codificación	1	2048	TCTTTGCTGCTTTCACTGAA	79	250
337337	Codificación	1	2144	ATGTTGTTTCTGCTGCTT	76	251
337338	Codificación	1	2149	ATGACATGTTGTTTCTGCTG	80	252
337339	Codificación	1	2154	AGCAAATGACATGTTGTTCA	84	253
337340	Codificación	1	2159	ATTTCTGACAAATGACATGTT	72	254
337341	Codificación	1	2164	TGATGATTTCTGACAAATGAC	74	255
337342	Codificación	1	2174	TTATAGCCCATGATGATTTT	81	256
337343	Codificación	1	2179	TGATCTTATAGCCCATGATG	84	257
337344	Codificación	1	2184	ATCCATGATCTTATAGCCCA	90	258
337345	Codificación	1	2190	GGTAGCATCCATGATCTTAT	86	259

Inhibición de niveles de ARNm de STAT3 humana por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2' MOE con una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
337346	Codificación	1	2232	AATGTCAGGATAGAGATAGA	55	260
337347	Codificación	1	2246	GCCTCCTCCTTGGAATGTC	88	261
337348	Codificación	154	2273	TCCGAATGCCTCCTCCTTGG	92	262
337349	Codificación	154	2278	TACTTTCCGAATGCCTCCTC	65	263
337350	Codificación	154	2283	GACAATACTTTCCGAATGCC	84	264
337351	Codificación	1	2303	CTACCTGGGTCAGCTTCAGG	74	265
337352	Codificación	1	2333	ATAAACTTGGTCTTCAGGTA	80	266
337353	Codificación	1	2351	GTCGTTGGTGTACACAGAT	81	267
337354	Codificación	1	2356	TGCAGGTCGTTGGTGTACA	62	268
337355	Codificación	1	2361	ATTGCTGCAGGTCGTTGGTG	61	269
337356	Codificación	1	2366	ATGGTATTGCTGCAGGTCGT	75	270
337357	Codificación	1	2371	GGTCAATGGTATTGCTGCAG	71	271
337358	Codificación	1	2381	GACATCGGCAGGTCAATGGT	77	272
337359	Codificación	154	2423	CAATGAATCTAAAGTGCGGG	57	273
337360	Codificación	154	2428	TGCATCAATGAATCTAAAGT	71	274
337361	Codificación	1	2413	CAAACCTGCATCAATGAATCT	61	275
337362	Codificación	1	2418	ATTTCCAAACTGCATCAATG	69	276
337363	Codificación	1	2456	AACTGCCCTCCTGCTGAGGG	63	277
337364	Codificación	1	2469	GGTGAGGGACTCAAACCTGCC	70	278
337365	3'UTR	1	2550	CAGTCGTATCTTTCTGCAGC	84	279
337366	3'UTR	1	2658	AGATAGCAGAAGTAGGAGAT	66	280
337367	3'UTR	1	2678	AAAGTGCCAGATTGCTCAA	82	281
337368	3'UTR	1	2684	TTTTTAAAGTGCCAGATT	59	282
337369	3'UTR	1	2713	CAGATCACCCACATTCACTC	88	283
337370	3'UTR	1	2729	TGCATTTAGATAAAAGCAGA	78	284
337371	3'UTR	1	2744	GAACACATCCTTATTTGCAT	76	285
337372	3'UTR	1	2759	ATCATGGGTCTCAGAGAACA	88	286
337373	3'UTR	154	2790	CACATCCCCTGATCATGGGT	70	287
337374	3'UTR	154	2826	AGACATTTCTTTTCTCCC	67	288
337375	3'UTR	154	2908	ACCAGGAGGCACTTGTCTAA	89	289
337376	3'UTR	154	2914	GCAGGCACCAGGAGGCACTT	83	290
337377	3'UTR	154	2941	GCTTACAGAAACAGGCAGAA	78	291

Inhibición de niveles de ARNm de STAT3 humana por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2' MOE con una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
337378	3'UTR	154	2959	AGGTGGCCTGTGGCATTTC	16	292
337379	3'UTR	154	2971	GTATGTAGCTATAGGTGGCC	71	293
337380	3'UTR	154	2983	GCAATGCCAGGAGTATGTAG	83	294
337381	3'UTR	154	2992	TTAAAAAGTGCAATGCCAGG	86	295
337382	3'UTR	154	3032	GGCTTAGATAGTCCTATCTT	84	296
337383	3'UTR	154	3047	TAAAAAGAAACCTAGGGCTT	81	297
337384	3'UTR	154	3108	ATACAGAAAGGCTATGCTGA	89	298
337385	3'UTR	154	3121	TTAAGTTTCTTAAATACAGA	70	299

Como se muestra en la Tabla 13, las SEQ ID Nos 159, 161, 165, 166, 169, 170, 171, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 215, 216, 217, 220, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 293, 294, 295, 296, 297, 298 y 299 inhiben la expresión de STAT3 humana al menos en 60%.

Ejemplo 13

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 humana que tienen alas 2'-MOE y una brecha desoxi

De acuerdo con la presente divulgación, se diseñó una serie adicional de oligonucleótidos para direccionar diferentes regiones de la STAT3 humana, utilizando secuencias publicadas (número de acceso GenBank® L29277 incorporada aquí como SEQ ID NO: 1, número de acceso GenBank® NM_139276.1, incorporada aquí como SEQ ID NO: 154). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 14. "Sitio objetivo" indica el primer número de nucleótido (más cercano a 5') sobre la secuencia objetivo particular al cual se enlaza el oligonucleótido. Todos los compuestos de la Tabla 14 son oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con brecha") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región central "brecha" consistente de diez 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleósido (esqueletos) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.

Los compuestos fueron probados en cuanto a sus efectos sobre la expresión de STAT3 humana en células A549. Las células fueron tratadas con 50 nM de oligonucleótidos antisentido mezclados con LIPOFECTIN™ 1.5 µL/mg. Las células fueron recolectadas aproximadamente 20 horas después de la transfección y se midió la expresión de ARNm de STAT3 utilizando PCR en tiempo real. Los datos son el promedio de 2 experimentos y se muestran en la Tabla 14 como porcentaje de inhibición con respecto a las células de control no tratadas.

Tabla 14

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 humana que tienen alas 2'- MOE y una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
345752	Codificación	1	631	GCATCTGCTGCTTCTCCGTC	54	300
345753	Codificación	1	633	CAGCATCTGCTGCTTCTCCG	40	301
345754	Codificación	1	635	TCCAGCATCTGCTGCTTCTC	47	302
345755	Codificación	1	636	CTCCAGCATCTGCTGCTTCT	22	303

ES 2 521 599 T3

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 humana que tienen alas 2'- MOE y una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
345756	Codificación	1	638	TGCTCCAGCATCTGCTGCTT	29	304
345757	Codificación	1	641	TGCTGCTCCAGCATCTGCTG	37	305
345758	Codificación	1	643	GGTGCTGCTCCAGCATCTGC	42	306
345759	Codificación	1	645	AAGGTGCTGCTCCAGCATCT	35	307
345760	Codificación	1	1663	TGGGATTGTTGGTCAGCATG	23	308
345761	Codificación	1	1668	ATTCTTGGGATTGTTGGTCA	42	309
345762	Codificación	1	1670	ACATTCTTGGGATTGTTGGT	42	310
345763	Codificación	1	1671	CACATTCTTGGGATTGTTGG	43	311
345764	Codificación	1	1673	TTCACATTCTTGGGATTGTT	35	312
345765	Codificación	1	1675	AGTTCACATTCTTGGGATTG	27	313
345766	Codificación	1	1677	GAAGTTCACATTCTTGGGAT	0	314
345767	Codificación	1	380	AGATTATGAAACACCAAAGT	18	315
345768	Codificación	1	382	GGAGATTATGAAACACCAAA	7	316
345769	Codificación	1	384	CAGGAGATTATGAAACACCA	38	317
345770	Codificación	1	387	TCCCAGGAGATTATGAAACA	46	318
345771	Codificación	1	388	CTCCCAGGAGATTATGAAAC	19	319
345772	Codificación	1	390	CTCTCCCAGGAGATTATGAA	32	320
345773	Codificación	1	392	ATCTCTCCCAGGAGATTATG	20	321
345774	Codificación	1	1872	CTTGCCAGCCATGTTTCTT	43	322
345775	Codificación	1	1874	CCCTTGCCAGCCATGTTTTC	26	323
345776	Codificación	1	1876	AGCCCTTGCCAGCCATGTTT	57	324
345777	Codificación	1	1880	GAGAAGCCCTTGCCAGCCAT	60	325
345778	Codificación	1	1882	AGGAGAAGCCCTTGCCAGCC	73	326
345779	Codificación	154	1904	GAAGGAGAAGCCCTTGCCAG	60	327
345780	Codificación	1	1877	AAGCCCTTGCCAGCCATGTT	61	328
345781	Codificación	1	1879	AGAAGCCCTTGCCAGCCATG	74	329
345782	Codificación	154	1905	AGAAGGAGAAGCCCTTGCCA	52	330
345783	Codificación	154	1907	CCAGAAGGAGAAGCCCTTGCC	39	331
345784	Codificación	154	1909	ACCCAGAAGGAGAAGCCCTT	48	332
345785	Codificación	1	2247	TGCCTCCTCCTTGGGAATGT	69	333
345786	Codificación	1	2249	AATGCCTCCTCCTTGGGAAT	3	334
345787	Codificación	1	2251	CGAATGCCTCCTCCTTGGGA	54	335

ES 2 521 599 T3

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 humana que tienen alas 2'- MOE y una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
345788	Codificación	154	2274	TTCCGAATGCCTCCTCCTTG	42	336
345789	Codificación	154	2275	TTTCCGAATGCCTCCTCCTT	1	337
345790	Codificación	154	2277	ACTTTCCGAATGCCTCCTCC	26	338
345791	Codificación	1	420	TTGCAGGAAGCGGCTATACT	24	339
345792	Codificación	1	422	TCTTGCAGGAAGCGGCTATA	42	340
345793	Codificación	1	424	ACTCTTGCAGGAAGCGGCTA	51	341
345794	Codificación	1	425	GACTCTTGCAGGAAGCGGCT	60	342
345795	Codificación	1	427	TCGACTCTTGCAGGAAGCGG	42	343
345796	Codificación	1	428	TTCGACTCTTGCAGGAAGCG	51	344
345797	Codificación	1	430	CATTGACTCTTGCAGGAAG	50	345
345798	Codificación	1	2176	TCTTATAGCCCATGATGATT	23	346
345799	Codificación	1	2178	GATCTTATAGCCCATGATGA	36	347
345800	Codificación	1	2180	ATGATCTTATAGCCCATGAT	30	348
345801	Codificación	1	2182	CCATGATCTTATAGCCCATG	57	349
345802	Codificación	1	2186	GCATCCATGATCTTATAGCC	51	350
345803	Codificación	1	2188	TAGCATCCATGATCTTATAG	31	351
345804	Codificación	1	2189	GTAGCATCCATGATCTTATA	11	352
345805	3'UTR	154	3102	AAAGGCTATGCTGATACAGT	62	353
345806	3'UTR	154	3104	AGAAAGGCTATGCTGATACA	46	354
345807	3'UTR	154	3106	ACAGAAAGGCTATGCTGATA	56	355
345808	3'UTR	154	3107	TACAGAAAGGCTATGCTGAT	46	356
345809	3'UTR	154	3109	AATACAGAAAGGCTATGCTG	51	357
345810	3'UTR	154	3110	AAATACAGAAAGGCTATGCT	27	358
345811	3'UTR	154	3112	TTAAATACAGAAAGGCTATG	3	359
345812	3'UTR	154	3114	TCTTAAATACAGAAAGGCTA	41	360
345813	3'UTR	1	2753	GGTCTCAGAGAACACATCCT	56	361
345814	3'UTR	1	2755	TGGGTCTCAGAGAACACATC	31	362
345815	3'UTR	1	2757	CATGGGTCTCAGAGAACACA	68	363
345816	3'UTR	1	2758	TCATGGGTCTCAGAGAACAC	42	364
345817	3'UTR	1	2761	TGATCATGGGTCTCAGAGAA	65	365
345818	3'UTR	1	2763	CCTGATCATGGGTCTCAGAG	22	366
345819	3'UTR	154	2765	CCCCTGATCATGGGTCTCAG	38	367

ES 2 521 599 T3

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 humana que tienen alas 2'- MOE y una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
345820	Codificación	154	1912	CAGACCCAGAAGGAGAAGCC	40	368
345821	Codificación	154	1914	GCCAGACCCAGAAGGAGAAG	52	90
345822	Codificación	154	1916	CAGCCAGACCCAGAAGGAGA	49	369
345823	Codificación	154	1917	CCAGCCAGACCCAGAAGGAG	64	370
345824	Codificación	154	1919	GTCCAGCCAGACCCAGAAGG	54	371
345825	Codificación	154	1920	TGTCCAGCCAGACCCAGAAG	43	372
345826	Codificación	154	1922	ATTGTCCAGCCAGACCCAGA	29	373
345827	Codificación	154	1924	ATATTGTCCAGCCAGACCCA	29	374
345828	Codificación	1	2181	CATGATCTTATAGCCCATGA	40	375
345829	Codificación	1	2183	TCCATGATCTTATAGCCCAT	26	376
345830	Codificación	1	2185	CATCCATGATCTTATAGCCC	37	377
345831	Codificación	1	2187	AGCATCCATGATCTTATAGC	34	378
345832	Codificación	1	2191	TGGTAGCATCCATGATCTTA	30	379
345833	Codificación	1	2192	TTGGTAGCATCCATGATCTT	18	380
345834	Codificación	1	2196	GATATTGGTAGCATCCATGA	21	381
106707	Codificación	1	386	CCCAGGAGATTATGAAACAC	19	18
106712	Codificación	1	639	CTGCTCCAGCATCTGCTGCT	45	23
106734	Codificación	1	1669	CATTCTTGGGATTGTTGGTC	39	45
106748	Codificación	1	2194	TATTGGTAGCATCCATGATC	18	59
106770	3' UTR	1	2760	GATCATGGGTCTCAGAGAAC	34	81
113171	Codificación	1	385	CCAGGAGATTATGAAACACC	47	110
113176	Codificación	1	637	GCTCCAGCATCTGCTGCTTC	52	115
113192	Codificación	1	1665	CTTGGGATTGTTGGTCAGCA	48	131
113196	Codificación	1	1881	GGAGAAGCCCTTGCCAGCCA	68	135
113202	Codificación	1	2252	CCGAATGCCTCCTCCTTGGG	66	141
337265	Codificación	154	446	CGACTCTTGCAGGAAGCGGC	62	92
337325	Codificación	154	1687	TTCTTGGGATTGTTGGTCAG	37	239
337332	Codificación	154	1898	GAAGCCCTTGCCAGCCATGT	60	246
337333	Codificación	154	1903	AAGGAGAAGCCCTTGCCAGC	58	247
337335	Codificación	154	1918	TCCAGCCAGACCCAGAAGGA	59	249
337344	Codificación	154	2204	ATCCATGATCTTATAGCCCA	46	258
337345	Codificación	154	2210	GGTAGCATCCATGATCTTAT	36	259

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 humana que tienen alas 2'- MOE y una brecha desoxi						
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
337348	Codificación	154	2273	TCCGAATGCCTCCTCCTTGG	68	262
337372	3' UTR	154	2779	ATCATGGGTCTCAGAGAACA	47	286
337384	3' UTR	154	3108	ATACAGAAAGGCTATGCTGA	44	298

Ejemplo 14

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 de ratón, que tienen alas 2'-MOE y una brecha desoxi

- De acuerdo con la presente invención, se diseñó una serie adicional de oligonucleótidos para direccionar diferentes regiones del ARN de STAT3 de ratón, utilizando secuencias publicadas (número de acceso GenBank® U06922.1, incorporado aquí como SEQ ID NO: 82, número de acceso GenBank® U30709.1, incorporada aquí como SEQ ID NO: 382). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 15. "Sitio objetivo" indica el primer número de nucleótido (más cerca de 5') sobre la secuencia objetivo particular al cual se enlaza el oligonucleótido. Todos los compuestos en la Tabla 15 son oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con brecha") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región "brecha" central consistente de diez 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleósido (esqueleto) son fosforotioato (P = S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.

Tabla 15

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 humana que tienen alas 2'- MOE y una brecha desoxi					
Isis #	Region	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencias	SEQ ID NO
29800	Codificación	82	2213	TGGTATTGCTGCAGGTCGTT	383
29801	Codificación	82	2224	CGGCAGGTCAATGGTATTGC	384
29802	Codificación	82	2230	GGACATCGGCAGGTCAATGG	385
29806	5'UTR	382	11	TTGTACCTCAGCGCGGACGC	386
134027	Codificación	82	2309	ACTCAAACCTGCCCTCCTGCT	95
337354	Codificación	82	2204	TGCAGGTCGTTGGTGTCACA	268
345821	Codificación	82	1742	GCCAGACCCAGAAGGAGAAG	90

- En una realización adicional, se diseñó una serie adicional de oligonucleótidos para direccionar ARN de STAT3 de ratón, utilizando secuencias publicadas (número de acceso GenBank® U06922.1, incorporado aquí como SEQ ID NO: 82). Los compuestos se muestran en la Tabla 16. "Sitio objetivo" indica el primer número de nucleótido (más cerca a 5') sobre la secuencia particular al cual se enlaza el compuesto. Todos los compuestos en la Tabla 16 son oligonucleótidos quiméricos compuestos de una región "brecha" consistente de doce 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" consistentes de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. El número de 2'-MOE nucleótidos en las brechas varía desde una longitud de 2 a 5 nucleótidos, con los 2'-desoxinucleótidos en tipografía plana y los 2'-MOE nucleótidos en tipografía resaltada. La estructura exacta de cada oligonucleótido está designada en la Tabla 16 como la estructura "alas". Una designación 5~10~5, por ejemplo, indica que los primeros y los últimos 5 nucleótidos son nucleótidos 2'-MOE y los 10 nucleótidos centrales son 2'-desoxinucleótidos. Los enlaces internucleósido (esqueletos) son fosforotioato (P = S) a lo largo del oligonucleótido. Los residuos citidina no modificados están subcalificados; todos los otros residuos citidina son 5-metilcitidinas.

Tabla 16

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 de ratón, con alas 2'-MOE y una brecha desoxi						
ISIS #	Region	SEQ ID NO Objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	Estructura de ala	SEQ ID NO
133003	3' UTR	82	2527	AAAAAGTGCCCAGATTGCC	5~12~5	99
346030	3' UTR	82	2527	AAAAGTGCCCAGATTQCCC	4~10~5	387
346031	3' UTR	82	2528	AAAAGTGCCCAGATTGCC	4~10~4	388
346032	3' UTR	82	2528	AAAGTGCCCAGATTGCC	3~10~4	389

En una realización adicional de la presente divulgación, se diseñó una serie adicional de oligonucleótidos para direccionar diferentes regiones del ARN de STAT3 de ratón, utilizando secuencias publicadas (número de acceso GenBank® U06922.1, incorporada aquí como SEQ ID NO: 82. Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 17. "Sitio objetivo" indica el primer número de nucleótido (más cerca a 5') en la secuencia particular al cual se enlaza el oligonucleótido. Todos los compuestos en la Tabla 17 están compuestos uniformemente de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleósido (esqueletos) son fosforotioato (P = S) a lo largo del oligonucleótido y todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.

Tabla 17

Oligonucleótidos 2'- MOE uniformes fosforotioados dirigidos a STAT3 de ratón					
Isis #	Región	SEQ ID NO objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	SEQ ID NO
29803	Codificación	82	2253	ATCAATGAATCTAAAGTGCG	93
29805	Codificación	82	2206	GCTGCAGGTCGTTGGTGTC	390

10 Ejemplo 15

Inhibición antisentido de STAT3 humana por oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y una brecha desoxi: respuesta a dosis

De acuerdo con la presente invención, un subconjunto de los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 humana fue investigado adicionalmente en estudios de respuesta a la dosis. Los compuestos fueron analizados en cuanto a su efecto sobre los niveles de ARNm de STAT3 humana en células T-24.

La línea celular T-24 de carcinoma de células de vejiga fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células T-24 fueron cultivadas de manera rutinaria en medio basal de McCoy 5A completo suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades por mL de penicilina y 100 microgramos por mL de estreptomycin (medios y suplementos de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células fueron pasadas rutinariamente por tripsinización y dilución cuando alcanzaron 90% de confluencia. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos ((Falcon-Primaria #3872, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de 7000 células/pozo para uso en experimentos de transfección por oligonucleótidos antisentido.

Los oligonucleótidos de control usados fueron ISIS 129695 (TTCTACCTCGCGCGATTAC, SEQ ID NO: 391), ISIS 129694 (GTACAGTTATGCGCGGTAGA SEQ ID NO: 392), ISIS 129690 (TTAGAATACGTCGCGTTATG SEQ ID NO: 393), ISIS 129686 (CGTTATTAACCTCCGTTGAA SEQ ID NO: 394), ISIS 116847 (CTGCTAGCCTCTGGATTGA, SEQ ID NO: 395) e ISIS 113529 (CTCTTACTGTGCTGTGGACA SEQ ID NO: 396). Estos oligonucleótidos no direccionaron a STAT3 y fueron utilizados como controles negativos.

Las células T-24 fueron tratadas con 18.75, 37.5, 75 o 150 nM de oligonucleótido mezclado con 3 ug/mL de LIPOFECTIN™ por 1.00 nM de oligonucleótido como está descrito en otros ejemplos aquí. Las células no tratadas sirvieron como control. Después de 16 horas de tratamiento, se preparó el ARN de las células para análisis subsecuente por PCR en tiempo real.

Los niveles de expresión de ARNm de STAT3 fueron cuantificados por PCR en tiempo real utilizando el conjunto de sonda de cebador PPS199 y las cantidades objetivo en el gen fueron analizadas utilizando RiboGreen® como se describió en otros ejemplos aquí. Los datos son promedio de 2 experimentos y se muestran en la Tabla 18. Una designación "-" o "+" indica un descenso o incremento de la expresión de ARNm de STAT3, respectivamente, con respecto a las células de control no tratadas.

Tabla 18

Inhibición de los niveles de ARNm de STAT3 humana por fosfotioato u oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y una brecha desoxi: respuesta a la dosis					
Porcentaje de cambio de expresión de STAT3 usando PPS199					
Concentración de oligonucleótido					
Isis #	SEQ ID NO	18.75 nM	37.5 nM	75 nM	150 nM
106747	58	-37	-48	-71	-84
337247	161	-23	-43	-62	-75
337270	184	-29	-41	-67	-87
337276	190	-40	-61	-76	-81
337284	198	-49	-64	-69	-72
337293	207	-26	-49	-66	-79
337303	217	-44	-61	-69	-72
337332	246	-63	-79	-87	-92
337333	247	-48	-73	-82	-88
337344	258	-27	-47	-63	-77
337348	262	-61	-77	-82	-86
337384	298	-40	-55	-71	-80
129695	391	+5	+2	+8	0
129694	392	+4	-3	-4	-10
129690	393	+2	+7	+6	+8
129686	394	+2	+1	-5	+1
116847	395	+7	+4	+8	+5
113529	396	+1	-1	-11	-26

Como se muestra en la Tabla 18, los compuestos probados inhiben la expresión de ARNm de STAT3 humana en una forma dependiente de la dosis.

- 5 La respuesta a la dosis fue repetida en células T-24 y se midieron cantidades de objetivo en el gen utilizando un conjunto de cebador-sonda diferente, llamado aquí PPS2033. El PPS2033 comprende sondas y cebadores para STAT3 humana que fueron diseñados para hibridar a una secuencia STAT3 humana, utilizando información de secuencia publicada (incorporada aquí como SEQ ID NO:154). Para PPS2033 los cebadores de PCR fueron: cebador de avance: GAGGCCCGCCCAACA (SEQ ID NO: 397) cebador reverso: TTCTGCTAATGACGTTATCCAGTTTT (SEQ ID NO: 398) y la sonda para PCR fue: FAM-CTGCCTAGATCGGC-MGB (SEQ ID NO: 399) donde FAM es el colorante informador fluorescente y MGB es el colorante de detención. Las
- 10 cantidades de objetivo de gen obtenidas por el PCR en tiempo real son normalizadas cuantificando el ARN total utilizando RiboGreen™ (Molecular Probes, Inc. Eugene, OR). Los oligonucleótidos de control usados fueron ISIS 129695 (SEQ ID NO: 391), ISIS 129694 (SEQ ID NO: 392), ISIS 129690 (SEQ ID NO: 393), ISIS 129686 (SEQ ID NO: 394), ISIS 116847 (SEQ ID NO: 395) e ISIS 113529 (SEQ ID NO: 396).
- 15 Las células T-24 fueron tratadas con 18.75, 37.5, 75, o 150 nM de oligonucleótido mezclado con 3 ug/mL de LIPOFECTIN™ por 100 nM de oligonucleótido como fue descrito en otros ejemplos aquí. Las células no tratadas sirvieron como controles. Después de 16 horas de tratamiento, se preparó ARN a partir de células para análisis subsecuente por PCR en tiempo real.
- 20 Los niveles de expresión de ARNm de STAT3 humana fueron cuantificados por PCR en tiempo real utilizando el conjunto de cebador sonda PPS2033 y las cantidades objetivo de gen fueron analizadas utilizando RiboGreen® como se describe en otros ejemplos aquí. Los datos son promedios de 2 experimentos mostrados en la Tabla 19.

Una designación "-" o "+" indica un descenso o incremento de la expresión de ARNm de STAT3, respectivamente, con respecto a células de control no tratadas.

Tabla 19

Inhibición de los niveles de ARNm de STAT3 humana por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos que tiene alas 2'-MOE y una brecha desoxi: respuesta a la dosis					
Porcentaje de cambio de la expresión de STAT3 usando PPS2033					
Isis #	SEQ ID NO	Concentración de oligonucleótido			
		18.75 nM	37.5 nM	75 nM	150 nM
106747	58	-32	-48	-62	-76
337247	161	+17	-21	-53	-69
337270	184	-16	-27	-67	-87
337276	190	-34	-58	-75	-81
337284	198	-49	-62	-66	-68
337293	207	-26	-49	-67	-79
337303	217	-47	-59	-69	-71
337332	246	-66	-79	-85	-91
337333	247	-46	-70	-82	-90
337344	258	-17	-37	-60	-76
337348	262	-53	-76	-83	-86
337384	298	-41	-59	-69	-80
129695	391	-4	+2	+8	+3
129694	392	+19	-1	+7	+2
129690	393	+4	+10	+8	+11
129686	394	+20	+16	+25	+9
116847	395	+45	+33	+22	-2
113529	396	+1	+12	-11	-24

5 Como se muestra en la Tabla 19, la medición de las cantidades de gen objetivo utilizando PPS2033 demuestra que los compuestos probados inhiben la expresión de ARNm de STAT3 humana de una forma dependiente de la dosis.

10 Se llevo a cabo un experimento adicional de respuesta a la dosis en células A549. Las células A549 fueron tratadas con 18.75, 37.5, 75, o 150 nM de oligonucleótido mezclado con 3 ug/mL de LIPOFECTIN™ por 100 nM de oligonucleótido como se describe en otros ejemplos aquí. Los oligonucleótidos de control fueron ISIS 129686 (SEQ ID NO: 394) e ISIS 129690 (SEQ ID NO: 393). Las células no tratadas sirvieron como control. Después de 16 horas de tratamiento, se preparó el ARN de células para el subsecuente análisis por PCR en tiempo real.

15 Los niveles de expresión de ARNm de STAT3 humana fueron cuantificados por PCR en tiempo real utilizando el conjunto cebador sonda PPS199 y las cantidades de objetivo en gen fueron normalizadas utilizando RiboGreen® como se describe en otros ejemplos aquí. Los datos son promedios de 2 experimentos mostrados en la Tabla 20. Una designación "-" o "+" en el resultado de respuesta a la dosis indica un descenso o incremento de la expresión de ARNm de STAT3, respectivamente, con respecto a las células de control no tratadas.

Tabla 20

Inhibición de los niveles de ARNm de STAT3 humana por fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos que tienen alas 2'-MOE y una brecha desoxi: respuesta a dosis					
Porcentaje de cambio de expresión de STAT3 en células A549 usando PPS199					
Concentración de oligonucleótido					
Isis #	SEQ ID NO	18.75 nM	37.5 nM	75 nM	150 nM
106734	45	-2	-16	-56	-73
337332	246	-31	-61	-77	-87
337333	247	-8	-39	-59	-75
337348	262	-26	-43	-55	-77
129686	394	+27	+23	+22	+19
129690	393	+30	+27	+16	+27

Como se muestra en la Tabla 20, los compuestos probados inhiben la expresión de ARNm de STAT3 humana en células A549 de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 16

5 Síntesis de ARN

En general, la química de síntesis de ARN está basada en la incorporación selectiva de diversos grupos protectores en reacciones intermediarias estratégicas. Aquella persona de experiencia normal en la técnica entenderá el uso de los grupos protectores en la síntesis orgánica, una clase útil de grupos protectores incluye éteres de sililo. En particular se utilizan éteres de sililo voluminosos para proteger el 5'-hidroxilo en combinación con un grupo protector ortoéster lábil a los ácidos en el 2'-hidroxilo. Este conjunto de grupos protectores se usa entonces con tecnología de síntesis estándar en fase sólida. Es importante finalmente retirar el grupo protector ortoéster lábil a ácidos después de todas las otras etapas sintéticas. Además, el uso temprano de grupos protectores sililo durante la síntesis asegura una fácil remoción cuando se desea, sin una desprotección indeseada del 2'-hidroxilo.

15 Siguiendo este procedimiento para la protección secuencial del 5'-hidroxilo en combinación con la protección del 2'-hidroxilo por grupos protectores que son retirados diferencialmente y son lábiles químicamente de manera diferenciada, se sintetizaron los oligonucleótidos de ARN.

20 Los oligonucleótidos de ARN se sintetizan en una forma paso a paso. Cada nucleótido es agregado secuencialmente (en la dirección 3' a 5') a un oligonucleótido enlazado a un soporte sólido. El primer nucleósido en el extremo 3' de la cadena se une covalentemente a un soporte sólido. El precursor nucleótido, una ribonucleósido fosforamidita y el activador son agregados, acoplando la segunda base en el extremo 5' del primer nucleósido. El soporte es lavado y se cubre cualquier grupo 5'-hidroxilo que no ha reaccionado con anhídrido acético para producir unidades estructurales 5'- acetilo. El enlace es oxidado entonces al enlace P (V) más estable y finalmente deseado. En el extremo del ciclo de adición de nucleótidos, el grupo 5'-sililo es escindido con fluoruro. El ciclo se repite para cada nucleótido subsecuente.

25 Después de la síntesis, los grupos protectores metilo en los fosfatos son escindidos en 30 minutos utilizando disodio-2-carbamoil-2-cianoetilen-1,1-ditiolato trihidrato (S_2Na_2) 1 M en DMF. La solución de desprotección se lava del oligonucleótido enlazado al soporte sólido usando agua. El soporte es tratado entonces con metilamina al 40% en agua durante 10 minutos a 55°C. Esto libera los oligonucleótidos de ARN a la solución, desprotege las aminas exocíclicas, y modifica los grupos 2'. Los oligonucleótidos pueden ser analizados por HPLC por intercambio aniónico.

30 Los grupos 2'-ortoéster son los últimos grupos protectores en ser removidos. El grupo protector ortoéster monoacetato de etilen glicol desarrollado por Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO), es un ejemplo de un grupo protector ortoéster útil el cual tiene las siguientes propiedades importantes. En estable a las condiciones de la síntesis de oligonucleósido fosforamidita y a la síntesis de oligonucleótidos. Sin embargo, después de la síntesis de oligonucleótidos el oligonucleótido es tratado con metilo amina la cual no solamente escinde el oligonucleótido del soporte sólido sino que también retira los grupos acetilo de los ortoésteres. Los sustituyentes resultantes 2-etil-hidroxilo sobre el ortoéster son menos ávidos de electrones que el precursor acetilado. Como resultado, el ortoéster modificado se hace más lábil a hidrólisis catalizada por ácido. Específicamente, la rata de escisión es aproximadamente 10 veces más rápida después de que los grupos acetilo son retirados. Por lo tanto, este ortoéster posee estabilidad suficiente con el fin de ser compatible con la síntesis de oligonucleótidos y aún más, cuando es

modificado subsecuentemente, permite llevar a cabo la desprotección bajo condiciones acuosas relativamente moderadas compatibles con el producto oligonucleótido de ARN final.

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

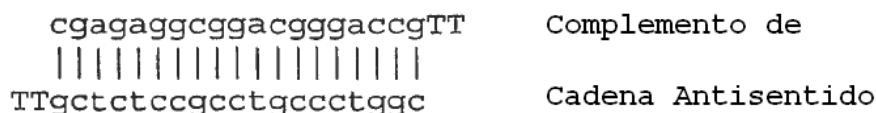
Los compuestos antisentido de ARN (oligonucleótidos de ARN) de la presente invención pueden ser sintetizados por los métodos descritos aquí adquiridos en Dharmacon Research, Inc (Lafayette, Co). Una vez sintetizados, los compuestos antisentido de ARN complementarios pueden ser entonces fusionados por métodos conocidos en la técnica para formar compuestos antisentido de cadena doble (dúplex). Por ejemplo, pueden formarse dúplex combinando 30 µl de cada una de las cadena complementarias de oligonucleótidos de ARN (solución de oligonucleótidos de ARN 50 uM) y 15 µl de regulador de fusión 5X (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH 7.4, acetato de magnesio 2 mM) seguida por calentamiento durante 1 minuto a 40°C, y luego 1 hora a 37°C. Los compuestos antisentido dúplex resultantes pueden ser utilizado en kits, ensayos, selecciones, u otros métodos para investigar el papel de un ácido nucleico objetivo, o para propósitos de diagnóstico o terapéuticos.

Ejemplo 17

Diseño y selección de compuestos antisentido dúplex direccionados a STAT3

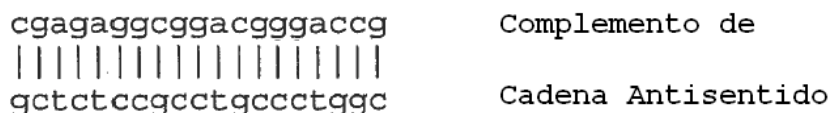
De acuerdo con la presente divulgación, una serie de dúplex de ácido nucleico que comprenden los compuestos antisentido de la presente invención y sus complementos pueden ser diseñados para apuntar a STAT3. La secuencia de nucleobases de la cadena antisentido del dúplex comprende al menos una porción de un oligonucleótido direccionado a STAT3 como se divulga aquí. Los extremos de las cadenas pueden ser modificados mediante la adición de una o más nucleobases naturales o modificadas para formar un sobrante. La cadena en sentido del ARNds es diseñada entonces y sintetizada como el complemento de la cadena antisentido y también puede contener modificaciones o adiciones en cada terminal. Por ejemplo, en una realización, ambas cadenas del dúplex ARNds serian complementarias sobre las nucleobases centrales, teniendo cada una sobrantes en uno o en ambos terminales. Las cadenas antisentido y en sentido del dúplex comprenden desde aproximadamente 17 a 25 nucleótidos, o desde aproximadamente 19 a 23 nucleótidos. Alternativamente, las cadenas antisentido y en sentido comprenden 20, 21 o 22 nucleótidos.

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



Los sobrantes pueden variar de 2 a 6 nucleobases y estas nucleobases pueden o pueden no ser complementarias al ácido nucleico objetivo. En otra realización, los dúplex pueden tener un sobrante solamente en un terminal.

En otra realización, un dúplex que comprende una cadena antisentido que tiene la misma secuencia CGAGAGGCGGACGGGACCG puede ser preparada con extremos cerrados (sin sobrantes de cadena sencilla) como se muestra:



El dúplex de ARN puede ser unimolecular o bimolecular, esto es, las dos cadenas pueden ser parte de una molécula individual o pueden ser moléculas separadas.

Las cadenas de ARN del dúplex pueden ser sintetizadas por métodos divulgados aquí o adquiridas en Dharmacon Research, Inc. (Lafayette, CO). Una vez sintetizadas, las cadenas complementarias son fusionadas. Se toma una alícuota de las cadenas sencillas y se diluye a una concentración de 50 uM. Una vez diluidas, se combinan 30 uL de cada cadena con 15 uL de una solución 5X de regulador de fusión. La concentración final de dicho regulador es

acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM pH 7.4 y acetato de magnesio 2 mM. El volumen final es 75 μ L. La solución es incubada durante 1 minuto a 90°C y luego se centrifuga durante 15 segundos. El tubo se deja en reposo durante 1 hora a 37°C tiempo después del cual los dúplex de ARNs se utilizan en experimentación. La concentración final del dúplex de ARNs es 20 μ M. Esta solución puede ser almacenada congelada (-20°C) y congelada-descongelada hasta 5 veces.

Una vez preparados, los compuestos antisentido dúplex son evaluados en cuanto a su capacidad para modular STAT3.

Cuando las células alcanzan el 80% de confluencia, se tratan con los compuestos antisentido dúplex de la divulgación. Para células cultivadas en placas de 96 pozos, los pozos son lavados una vez con 200 L de OPTI-MEM-1™ medio de suero reducido (Gibco BRL) y luego tratados con 130 L de OPTI-MEM-1™ que contienen 12 g/mL de LIPOFECTIN™ (Gibco BRL) y el compuesto antisentido dúplex deseado a una concentración final de 200 nM (una relación de 6 g/mL de LIPOFECTIN™ por 100 nM de compuesto antisentido dúplex). Después de 5 horas de tratamiento, el medio es reemplazado con medio fresco. Las células son recolectadas 16 horas después del tratamiento, momento en el cual el ARN es aislado y la reducción del objetivo se mide por RT-PCR.

Una serie de dúplex de ácidos nucleicos que comprenden los compuestos antisentido de la presente divulgación y sus complementos fue diseñada para direccionar al ARNm de STAT3, utilizando la secuencia publicada (número de acceso GenBank® L29277, incorporada aquí como SEQ ID NO: 1). La secuencia de nucleobases de la cadena antisentido del dúplex es 20 nucleótidos de longitud. Las secuencias de la cadena antisentido están listadas en la Tabla 21. La cadena en sentido de la ARNs está diseñada y sintetizada como el complemento de la cadena antisentido.

Todos los compuestos de la Tabla 21 son oligodesoxinucleótidos, de 21 nucleótidos de longitud siendo los dos nucleótidos en el extremo 3' el sobrante TT y con enlaces fosfodiéster internucleósido (esqueletos) a todo lo largo. Estas secuencias muestran contener timina (T) pero una persona experimentada en la técnica apreciará que la timina (T) es reemplazada en general por uracilo (U) en secuencias de ARN.

Tabla 21

sARNds direccionado a STAT3 humana					
ISIS #	Región	Sitio objetivo	SEQ ID objetivo	Secuencia	SEQ ID NO
330249	Codificación	1669	1	ATTCTTGGGATTGTTGGTCTT	400
330247	Codificación	637	1	CTCCAGCATCTGCTGCTTCTT	401

Los compuestos en la Tabla 21 fueron probados en cuanto a sus efectos sobre la expresión de STAT3 humana en células A549. El ISIS 330249 que comprendía ARNs y sus objetivos complementan el mismo sitio como oligonucleótido antisentido ISIS 106734 (SEQ ID NO: 45) y el ARNs que comprende ISIS 330247 y su complemento apuntan al mismo sitio que el oligonucleótido antisentido ISIS 113176 (SEQ ID NO: 115); así, ISIS 106734 e ISIS 113176 también fueron probados. Células A549 fueron tratadas con oligonucleótidos mezclados con LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) como se describe aquí. Las concentraciones de oligonucleótidos usadas están indicadas en la Tabla 22. El oligonucleótido de control usado fue ISIS 129698 (TTT GATCGAGGTTAGCCGTG, SEQ ID NO: 402). Las células fueron tratadas con oligonucleótido durante 4 horas y recolectadas unas 16 horas adicionales después. Las células no tratadas sirvieron como control.

Los niveles de expresión de ARNm de STAT3 humana fueron cuantificados por PCR en tiempo real utilizando el conjunto de sonda cebador PPS199 y las cantidades de objetivo en el gen fueron normalizadas utilizando Ribogreen™ como se describió en otros ejemplos aquí. Los datos son promedios de 2 experimentos que se muestran en la Tabla 22. Una designación “-” o “+” indica un descenso o incremento de la expresión de ARNm en STAT3, respectivamente, con respecto a células de control no tratadas. Cuando está presente, “N.D.” indica no determinado.

Tabla 22

Inhibición de niveles de ARNm de STAT3 por sARNds							
Cambio en porcentaje de la expresión de ARNm STAT3 en células A549 por compuestos antisentido dúplex							
Concentración de oligonucleótidos							
Isis #	SEQ ID NO	12.5 nM	25 nM	50 nM	100 nM	200 nM	400 nM
330249	400	-64	-70	-80	-83	-87	-81
106734	45	-5	-5	-40	-56	-67	-77

330247	401	+11	-19	-15	-16	-20	-48
113176	115	+8	+17	+6	0	-22	-34
129698	402	N.D	N.D.	+41	+42	+1	+22

Ejemplo 18

Inhibidor de crecimiento tumoral en modelos de ratón LNCaP de carcinoma de próstata

El modelo murínico LNCaP de carcinoma de próstata humano es descrito en Kiyama et al., Cancer Res. 63:3575-3584, 2003. En resumen, se cultivaron células de carcinoma prostático humano LNCaP y se mantuvieron en medio RPMI (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementadas con suero bovino fetal al 5% activado por calor. Aproximadamente 1×10^6 células de LNCaP fueron inoculadas subcutáneamente con 0.1 ml de Matrigel (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) en la región de flanco de ratones lampiños atímicos machos de 6 - 8 semanas de edad (Harlan Sprague Dawley, Inc., Indianapolis, IN) a través de una aguja calibre 27 bajo anestesia con metoxifluorano. Los ratones portadores de tumor entre 300 y 500 mm³ en volumen fueron castrados a través de metodología escrotal y asignados aleatoriamente a tratamiento con 10 mg/kg de antisentido humana ISIS 113176 (SEQ ID NO: 115) u oligonucleótido de STAT3 de control no coincidente humano ISIS 129987 (SEQ ID NO: 404) por vía intraperitoneal cinco veces por semana para la primera semana seguida por tres veces por semana posteriormente. El tratamiento comenzó un día después de la castración. Los volúmenes tumorales y las mediciones de antígeno específico para próstata (PSA) en suero fueron llevados a cabo una vez a la semana. Los volúmenes tumorales fueron calculados por la fórmula $L \times W \times H \times 0.5236$ (Gleave et al., Cancer Res. 51:1598-1605, 1992). Las muestras de sangre fueron obtenidas de incisiones de la vena de la cola de los ratones, y los niveles de PSA en suero fueron determinados mediante un kit de inmunoensayo enzimático con un límite inferior de sensibilidad de 0.2 mg/litro (Abbott IMX, Montreal, Quebec, Canadá) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

La ISIS 113176 suprimió la inducción de niveles de PSA en suero y crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto LNCaP en ratones lampiños castrados. El tratamiento similar de los ratones con el oligonucleótido de control no coincidente ISIS 129987 no tuvo efecto. Los efectos mediados por el oligonucleótido antisentido STAT3 sobre PCA y el volumen tumoral fueron significativamente diferentes del oligonucleótido no coincidente ISIS 129987 o con controles tratados con solución salina (prueba t de Student, $p \leq 0.50$). Los efectos del tratamiento fueron demostrados al final del periodo observación. (10 semanas después de la castración).

Para direccionar la toxicidad específica del objetivo potencial de esta metodología, se trataron ratones normales por vía subcutánea con un oligonucleótido antisentido de STAT3 murínico optimizado (hasta 50 mg/kg tres veces a la semana durante 2 semanas) y se evaluaron los efectos farmacodinámicos y toxicológicos en la sangre, hígado y médula ósea. El tratamiento con oligonucleótido antisentido de STAT3 dio como resultado una reducción del 85% en ARNm en hígado y una inhibición significativa de la proteína de STAT3 en la subpoblación premonocítica de la médula ósea. No se observaron cambios manifiestos en los recuentos en sangre entera, histología de hígado o subpoblaciones en médula ósea en animales tratados con oligonucleótido antisentido de STAT3. La expresión en hígado y médula ósea de STAT3 fue reducida significativamente por tratamiento con el oligonucleótido antisentido de STAT3. Así, los oligonucleótidos antisentido para STAT3 representan una oportunidad terapéutica para el tratamiento de cáncer de próstata.

Ejemplo 19

Inhibición antisentido de STAT3 humana en hepatocitos humanos primarios: respuesta a la dosis

En una realización adicional, los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 humana fueron seleccionados para estudios de respuesta a la dosis en hepatocitos humanos primarios. Los hepatocitos humanos primarios fueron adquiridos de InVitro Technologies (Baltimore, MD). Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos (Falcon-Primaria, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de 50,000 células/pozo en un medio de DMEM con alta glucosa suplementado con suero de bovino fetal al 10%, 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (medio y suplementos de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células se dejaron adherir durante la noche, y fueron tratadas con oligonucleótidos antisentido al día siguiente.

Los oligonucleótidos antisentido probados en este ensayo fueron ISIS 113196, ISIS 337332, ISIS 337333, ISIS 345778, ISIS 345781, ISIS 345794, ISIS 345815 e ISIS 345823. Las células fueron tratadas con 5, 10, 25, 50 y 150 nM de oligonucleótidos antisentido mezclados con LIPOFECTIN™, a una concentración de 3 µg /mL de LIPOFECTIN™ por 100 nM de oligonucleótido. Las células no tratadas sirvieron como control contra el cual fueron normalizados los datos. Después de 4 horas, el medio de cultivo fue reemplazado y las células fueron cultivadas durante 20 horas adicionales. El ARN fue aislado y se midieron los niveles de ARNm de STAT3 por PCR en tiempo real, utilizando PPS199, como se describió aquí. Los datos fueron obtenidos en triplicado y promediados. Los resultados se muestran en la Tabla 23 como porcentaje de expresión de ARNm con respecto al control no tratado.

Para cada oligonucleótido antisentido probado, se muestran en la Tabla 24 la IC₅₀, la concentración de oligonucleótido antisentido a la cual se inhibe la expresión de ARNm de STAT3 en un 50%.

Tabla 23

Inhibición de la expresión de ARNm de STAT3 humana en hepatocitos humanos primarios							
Tratamiento	SEQ NO	ID	% de control				
			Dosis (nM)				
			5	10	25	50	150
113196	135		88	80	73	33	28
337332	246		84	74	74	55	31
337333	247		72	81	90	49	31
345778	326		81	79	58	80	31
345781	329		72	89	61	77	35
345794	342		51	29	13	7	2
345815	363		67	80	86	50	29
345823	370		120	129	65	40	16

Tabla 24

IC ₅₀ para inhibición con antisentido de STAT3		
Tratamiento	SEQ ID NO	IC ₅₀ (nM)
113196	135	36
337332	246	53
337333	247	51
345778	326	84
345781	329	82
345794	342	4
345815	363	49
345823	370	37

- 5 Como se muestra en la Tabla 23, las ISIS 113196, ISIS 337332, ISIS 345794, e ISIS 345823 redujeron los niveles de ARNm de STAT3 humano en hepatocitos humanos primarios de una forma dependiente de la dosis. Como se muestra en la Tabla 24, ISIS 345794 exhibe la IC₅₀ más baja.

- 10 Se muestran en la Tabla 25 niveles de expresión de STAT1 en las células descritas anteriormente. Los niveles de expresión de STAT1 fueron medidos por PCR en tiempo real utilizando cebadores y sondas diseñados por métodos de rutina en la técnica y descritos aquí (por ejemplo, Primer Express®, Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tabla 25

Expresión de ARNm de STAT1 humana en hepatocitos humanos primarios tratados con oligonucleótidos antisentido que apuntan a STAT3						
Tratamiento	SEQ NO	ID	% de control			
			Dosis de oligonucleótido antisentido de STAT3 (nM)			
			5	10	25	50
113196	135		113	103	12 5	10 8

337332	246	102	102	14 2	13 6	349
337333	247	80	121	87	10 5	264
345778	326	92	190	18 7	16 8	582
345781	329	149	122	13 4	16 9	406
345794	342	232	138	19 0	21 2	438
345815	363	158	117	18 7	18 7	272
345823	370	119	110	85	18 7	305

Como se muestra en la Tabla 25, los nucleótidos antisentido direccionados a STAT3 no causaron una inhibición sustancial o dependiente de la dosis de la expresión de STAT1. Un análisis con herramientas de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST), una técnica de análisis genético conocida en el arte, de ISIS 345794 reveló que no había homologías con moléculas de ácido nucleico diferentes a STAT3.

5 Ejemplo 20

Inhibición antisentido de STAT3 humana en células HepG2: respuesta a la dosis

En una realización adicional, se seleccionaron oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 humana para estudios de respuesta a la dosis en células HepG2.

La línea celular de hepatoblastoma humano HepG2 fue obtenida de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Las células HepG2 fueron cultivadas de manera rutinaria en Eagle MEM ajustado para contener 1.5 g/L de bicarbonato de sodio y suplementado con suero bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, y piruvato de sodio 1 mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células fueron pasadas de manera rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzaron aproximadamente 90% de confluencia. Las placas de cultivo multipozos fueron preparadas para cultivo celular recubriéndolas con una dilución 1:100 de colágeno de cola de rata tipo 1 (BD Biosciences, Bedford, MA) en solución salina regulada con fosfato. Las placas que contenían colágeno fueron incubadas a 37°C durante aproximadamente 1 hora, después de la cual el colágeno fue retirado y los pozos fueron lavados dos veces con solución salina regulada con fosfato. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (Falcon-Primaria #3872, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de aproximadamente 8,000 células/pozo para uso en experimentos de transfección de compuestos oligoméricos.

Los oligonucleótidos antisentido probados en este ensayo fueron ISIS 113196, ISIS 337332, ISIS 337333, ISIS 345778, ISIS 345781, ISIS 345794, ISIS 345815 e ISIS 345823. Las células fueron tratadas con 5, 10, 25, 50 y 150 nM de oligonucleótido antisentido mezclados con LIPOFECTIN™, a una concentración de 3 µg/mL de LIPOFECTIN™ por 100 nM de oligonucleótido. Células no tratadas sirvieron como control contra el cual se normalizaron los datos. Después de 4 horas, el medio de cultivo fue reemplazado y las células fueron cultivadas durante 20 horas adicionales. El ARN fue aislado y los niveles de ARNm de STAT3 fueron medidos por PCR en tiempo real utilizando el conjunto de cebador sonda PPS199, descrita aquí. Los datos fueron obtenidos en triplicado y promediados. Los resultados se muestran en la Tabla 26 como porcentaje de la expresión de ARNm con respecto al control no tratado. Se muestra también la IC₅₀, la concentración del compuesto antisentido a la cual se inhibe en 50% la expresión de ARNm de STAT3.

Tabla 26

Inhibición de expresión de ARNm de STAT3 humana en células HepG2								
Tratamiento	SEQ ID NO	% control						IC50 (nM)
		Dosis (nM)						
		1	10	25	50	100	200	
113196	135	75	40	26	12	11	12	7
337332	246	73	47	30	13	7	17	9
337333	247	91	47	29	15	15	16	10
345778	326	94	55	26	13	13	24	12
345781	329	66	52	19	7	6	14	11

345794	342	63	14	5	2	1	0	6
345815	363	52	23	19	11	12	12	5
345823	370	66	65	34	21	13	12	15

Como se muestra en la Tabla 26, las ISIS 113916, ISIS 337333, ISIS 345794, ISIS 345815, e ISIS 345823 produjeron una reducción dependiente de la dosis en la expresión de ARNm de STAT3 en células HepG2.

Se muestran en la Tabla 27 niveles de expresión de STAT1 en células tratadas con oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 descritos anteriormente. Los niveles de ARNm de STAT1 fueron medidos por PCR en tiempo real utilizando los cebadores y sondas diseñados por métodos rutinarios en el arte y descritos aquí.

Tabla 27

Expresión de ARNm de STAT1 humana en células HepG2 tratadas con oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3								
Tratamiento	SEQ NO	ID	% control					
			Dosis (nM)					
			1	10	25	50	100	200
113196	135		87	94	96	10 1	89	79
337332	246		82	84	96	10 7	82	30
337333	247		91	87	10 9	83	87	56
345778	326		112	84	96	99	61	50
345781	329		93	114	13 5	14 3	93	40
345794	342		115	112	10 5	77	93	57
345815	363		84	113	11 2	93	58	61
345823	370		115	115	16 1	13 1	115	94

Como se muestra en la Tabla 27 los oligonucleótidos de STAT3 no produjeron una inhibición sustancial o dependiente de la dosis de la expresión de STAT1.

Los niveles de proteína de STAT3 fueron medidos también después de la transfección de células HepG2 con oligonucleótidos antisentido. Las células fueron tratados con dosis de 10 nM, 50 nM o 100 nM de oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 y los niveles de proteína de STAT3 fueron medidos por transferencia Western utilizando un anticuerpo de STAT3 disponible comercialmente (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), el cual fue detectado utilizando reactivos ECLplus™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y cuantificado utilizando el Chemidoc™ EQ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La proteína expresada por el gen cuidador G3PDH fue utilizada para normalizar las diferencias en niveles de proteína entre las muestras. Los datos se muestran en la Tabla 28, expresados como porcentaje de expresión de proteína con respecto a las células de control no tratadas.

Tabla 28

Inhibición de la expresión de proteína de STAT3 en células HepG2					
Tratamiento	SEQ NO	ID	% control		
			Dosis (nM)		
			10	50	100
113196	135		100	28	13
337332	246		94	29	12
337333	247		104	23	12
345778	326		66	17	8
345781	329		83	17	7

Inhibición de la expresión de proteína de STAT3 en células HepG2				
Tratamiento	SEQ ID NO	% control		
		Dosis (nM)		
		10	50	100
345794	342	96	28	19
345815	363	82	32	19
345823	370	99	46	31

Como se muestra en la Tabla 28, el tratamiento con ISIS 113196, ISIS 337332, ISIS 337333, ISIS 345778, ISIS 345781, ISIS 345794, ISIS 345815, e ISIS 345823 produjeron una reducción dependiente de la dosis de los niveles de proteína de STAT3 en células HepG2.

5 Ejemplo 21

Inhibición antisentido de STAT3 humana en células A549: respuesta a la dosis

Se probaron oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 humana en un estudio de respuesta a la dosis en células A549. Las células fueron tratadas con oligonucleótidos antisentido mezclados con LIPOFECTIN™, a una concentración de 3 µg/mL de LIPOFECTIN™ por 100 nM de oligonucleótido. Las concentraciones de oligonucleótido se indican en las Tablas 29 y 30. Las células no tratadas sirvieron como control contra el cual se normalizaron los datos. Los niveles de expresión de ARNm de STAT3 fueron medidos en duplicado, utilizando 2 diferentes conjuntos de cebador sonda, ambos descritos aquí: PPS199 y PPS2033. Los datos utilizando PPS2033 y PPS199 se muestran en las Tablas 29 y 30, respectivamente, como porcentaje de expresión con respecto a los controles no tratados.

15 Tabla 29

Inhibición antisentido de STAT3 humana en células A549 medida usando PPS2033					
Tratamiento	SEQ ID NO	% control			
		Dosis de oligonucleótidos (nM)			
		9.375	18.75	37.5	75
106734	45	97	92	46	21
113176	115	91	78	58	27
113196	135	80	71	15	5
337332	246	104	70	21	10
337333	247	93	67	28	10
337348	262	84	73	30	17
345778	326	92	63	17	8
345781	329	97	50	19	8
345785	333	87	68	23	10
345815	363	85	70	35	20
345823	370	91	96	50	33
129690	393	83	88	96	103
129691	410	122	105	109	119
129695	391	79	92	90	102
141923	409	98	106	95	98

Como se muestra en la Tabla 29, todos los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 humana inhibieron la expresión en células A459, medidas utilizando PPS2033.

Tabla 30

Inhibición antisentido de STAT3 humana en células A549 medida usando PPS199					
		% de control			
		Dosis de oligonucleótidos (nM)			
Tratamiento	SEQ ID NO	9.375	18.75	37.5	75
106734	45	85	62	26	10
113176	115	90	83	51	26
113196	135	97	70	17	8
337332	246	123	81	22	9
337333	247	76	51	14	4
337348	262	109	89	34	14
345778	326	76	36	6	2
345781	329	107	59	21	6
345785	333	79	45	9	2
345815	363	124	83	31	16
345823	370	136	111	70	35
129690	393	130	124	142	151
129691	410	101	126	128	107
129695	391	128	125	136	143
141923	409	88	92	84	76

Como se muestra en la Tabla 30, los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 humana inhibieron la expresión en una forma dependiente de la dosis en células A549, medida utilizando PS199.

- 5 Se llevo a cabo un experimento adicional de respuesta a la dosis de la misma manera. Utilizando un rango alternativo de concentraciones de oligonucleótidos antisentido. Los datos utilizando conjuntos cebador sonda PPS2033 y PPS199 se muestran en la Tablas 31 y 32, respectivamente, como porcentaje de la expresión de ARNm de STAT3 con respecto a las células de control no tratadas.

Tabla 31

Inhibición antisentido de STAT3 humana en células A549 medida usando PPS2033					
		% de control			
		Dosis de oligonucleótidos (nM)			
Tratamiento	SEQ ID NO	18.75	37.5	75	150
106734	45	87	52	23	11
113176	115	114	68	24	20
113196	135	82	26	10	6
337332	246	88	49	14	7
337333	247	53	25	9	9
337348	262	56	35	10	2
345778	326	59	22	9	7
345781	329	83	39	7	3
345785	333	70	37	15	9

345815	363	50	27	13	7
345823	370	77	58	23	6
129690	393	102	110	111	103
129691	410	89	87	103	112
129695	391	108	112	121	129
141923	409	88	99	86	78

Los datos en la Tabla 31 demuestran que las concentraciones adicionales probadas también inhibieron la STAT3 humana en una forma dependiente de la dosis.

Tabla 32

Inhibición antisentido de STAT3 humana en células A549 medida usando PPS199					
		% de control			
		Dosis de oligonucleótidos (nM)			
Tratamiento	SEQ ID NO	18.75	37.5	75	150
106734	45	85	57	31	16
113176	115	101	64	33	19
113196	135	90	23	12	7
337332	246	76	47	14	5
337333	247	63	32	14	11
337348	262	67	45	13	5
345778	326	60	27	12	11
345781	329	94	50	12	5
345785	333	57	31	14	9
345815	363	44	25	13	7
345823	370	63	65	24	4
129690	393	99	102	116	98
129691	410	72	79	83	88
129695	391	104	105	142	137
141923	409	107	87	96	80

Los datos en la Tabla 32 demuestran que las concentraciones adicionales probadas también inhiben la STAT3 humana en una forma dependiente de la dosis.

Ejemplo 22

Inhibición antisentido de STAT3 humana en células Hep3B: respuesta a la dosis

La inhibición antisentido de STAT3 fue probada en un estudio de respuesta a la dosis en células Hep3B.

La línea celular de hepatoma humano Hep3B (Hep3B2.1-7) se obtiene de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Esta línea celular fue derivada inicialmente de un carcinoma hepatocelular de un afroamericano masculino de 8 años de edad. Las células eran epiteliales en morfología y tumorigénicas en ratones lampiños. Las células Hep3B fueron cultivadas de manera rutinaria en Minimum Essential Medium (MEM) con solución salina balanceada de Earle, L-glutamina 2 mM, 1.5 g/l de bicarbonato de sodio, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, piruvato de sodio 1.0 mM (ATCC #20-2003, Manassas, VA) y con suero bovino fetal al 10% inactivado por

calor (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células se pasan de manera rutinaria por tripsinización y dilución cuando alcanzan el 90% de confluencia.

Las células fueron tratadas con los oligonucleótidos antisentido ISIS 129688, ISIS 113196, ISIS 337333, ISIS 345794, ISIS 345815, o el oligonucleótido de control ISIS 129688 (TTCGCGGCTGGACGATTTCAG, incorporado aquí como SEQ ID NO: 411), mezclado cada uno con LIPOFECTIN™, a una concentración de 3 µg/mL de LIPOFECTIN™ por 100 nM de oligonucleótido. La ISIS 129688, la cual no apunta a STAT3 es un "oligómero con brecha" de 20 nucleótidos que consiste de diez 2'-desoxinucleótidos flanqueados en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. La ISIS 129688 tenía un esqueleto fosforotioato a lo largo del oligonucleótido, y todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.

- 10 Las concentraciones de oligonucleótidos fueron 6.25 nM, 25 nM, 50 nM, y 100 nM. Las células no tratadas sirvieron como el control contra el cual fueron normalizadas. Los niveles de expresión de ARNm de STAT3 fueron medidos en duplicado por PCR en tiempo real, como se describe aquí, usando PPS2033. Los datos se muestran en la Tabla 33 como porcentaje de expresión con respecto a los controles no tratados.

Tabla 33

Inhibición de la expresión de STAT3 en células Hep3B: respuesta a la dosis					
Tratamiento	SEQ ID NO	% de control			
		Dosis (nM)			
		100	50	25	6.25
113196	135	57	24	17	98
337333	247	50	35	25	23
345794	342	94	77	125	112
345815	363	74	99	89	104
129688	411	82	27	13	92

- 15 Como se muestra en la Tabla 33, el tratamiento con las ISIS 113926, ISIS 337333, ISIS 345815 o ISIS 345815 produjo una reducción dependiente de la dosis en la expresión de ARNm de STAT3 en células Hep3B. La ISIS 345794 redujo la expresión de ARNm de STAT3 en la dosis de 50 nM en células Hep3B.

Ejemplo 23

Inhibición antisentido de STAT3 humana en células THLE-2: respuesta a la dosis

- 20 La inhibición antisentido de STAT3 fue probada en un estudio de respuesta a la dosis en células THLE-2.

La línea celular epitelial de hígado transformada por SV-40 THLE-2 fue obtenida del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) y cultivada de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las células fueron sembradas a una densidad de aproximadamente 10,000 células por pozo en placas de 96 pozos para uso en experimentos de transfección con oligonucleótidos.

- 25 Las células fueron tratadas con los oligonucleótidos antisentido ISIS 129688, ISIS 113196, ISIS 337333, ISIS 345794, ISIS 345815, o con el oligonucleótido de control ISIS 129688, mezclados cada uno con LIPOFECTIN™, a una concentración de 3 µg/mL de LIPOFECTIN™ por 100 nM de oligonucleótido. Las concentraciones de oligonucleótidos fueron 6.25 nM, 25 nM, 50 nM, y 100 nM. Las células no tratadas sirvieron como el control contra el cual fueron normalizados los datos. Los niveles de expresión de ARNm de STAT3 fueron medidos en duplicado por PCR en tiempo real, como se describe aquí, usando PPS2033. Los datos se muestran en la Tabla 34 como porcentaje de expresión con respecto a los controles no tratados.

Tabla 34

Inhibición de la expresión de STAT3 en células THLE-2: respuesta a la dosis					
Tratamiento	SEQ ID NO	% de control			
		Dosis (nM)			
		100	50	25	6.25
113196	135	93	13	6	5
337333	247	117	30	14	11
345794	342	111	32	16	21

Inhibición de la expresión de STAT3 en células THLE-2: respuesta a la dosis					
Tratamiento	SEQ ID NO	% de control			
		Dosis (nM)			
		100	50	25	6.25
345815	363	104	31	16	12
129688	411	93	95	83	72

Como se muestra en la Tabla 34, el tratamiento con ISIS 113926, ISIS 337333, o ISIS 345815 produjo una reducción dependiente de la dosis en la expresión de RNAm de STAT3 en células THLE-2. La ISIS 354794 también redujo la expresión de RNAm de STAT3 en células THLE-2.

Ejemplo 24

5 Diseño y selección de sARNds direccionada a STAT3 humana

En una realización adicional, una serie de dúplex de ácido nucleico fue diseñada para direccionar a RNAm de STAT3 (número de acceso GenBank® NM_139276.2, incorporada aquí como SEQ ID NO: 412) y se muestra en la Tabla 35. Todos los compuestos en la Tabla 35 son oligorribonucleótidos de 19 nucleótidos de longitud con enlaces fosfodiéster internucleósido (esqueletos) a lo largo del mismo. Los compuestos fueron preparados para tener extremos cerrados. La Tabla 35 muestra la cadena antisentido del ARNs y la cadena en sentido es sintetizada como complemento de la cadena antisentido. Estas secuencias demuestran contener uracilo (U) pero una persona experimentada en la técnica apreciará que el uracilo (U) es reemplazado en general por timina (T) en la secuencia de ADN. "Sitio objetivo" indica el primer número de nucleótido (más cercano a 5') sobre la secuencia objetivo particular al cual se enlaza el compuesto.

Los compuestos de la Tabla 35 fueron probados en cuanto a sus efectos sobre el RNAm de STAT3 en células A549. Los controles de ARNs que no direccionan a STAT3 humana incluyen el dúplex de ISIS 335449 (UUUGUCUCUGGUCCUUACUU; incorporada aquí como SEQ ID NO: 413) y su complemento, y el dúplex de ISIS 359661 (UUAUCGCUUCUCGUUGCUU; incorporada aquí como SEQ ID NO: 414) y su complemento. La ISIS 335449 es un oligorribonucleótido de 20 nucleótidos de longitud con enlaces fosfodiéster internucleósido (esqueletos) a lo largo del compuesto. La ISIS 359661 es un oligorribonucleótido de 19 nucleótidos de longitud con enlaces fosfodiéster internucleósido (esqueletos) a lo largo del compuesto. Tanto la ISIS 335449 y la ISIS 359661 y sus complementos fueron preparados con extremos cerrados. La ISIS 129700 (TAGTGCGGACCTACCCACGA, incorporada aquí como SEQ ID NO: 415), la cual no direcciona a STAT3, fue utilizada como oligonucleótido de cadena sencilla de control. La ISIS 129700 es un oligonucleótidos ("oligómero con brecha") quimérico de 20 nucleótidos de longitud, compuesto de una región "brecha" central consistente de diez 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en los extremos 5' y 3' por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleósido (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todas las citidinas son 5-metilcitidinas.

Las células A549 fueron tratadas con 150 nM de compuestos ARNs mezclados con 15 g/mL de LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) o 150 nM de oligonucleótidos de cadena sencilla mezclados con 15 g/mL de LIPOFECTIN™ durante un periodo de 4 horas seguido por 20 horas de cultivo en medio de cultivo normal.

La expresión de RNAm de STAT3 humana fue medida como se describió aquí en otros ejemplos, usando PPS2033. Los resultados fueron normalizados con respecto a células de control no tratadas, las cuales no fueron tratadas con los compuestos de ARNs o con los oligonucleótidos de cadena sencilla. Los datos son el promedio de 2 experimentos y se presentan en la Tabla 35.

Tabla 35

Inhibición de RNAm de STAT3 humana por sARNds en células A549						
Isis #	Región	SEQ Objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
36195 8	Codificación	412	520	CCAUUGGCUUCUCAAGAU	0	416
36195 9	Codificación	412	892	GCCCCGCCAGCUCACUCAC	33	417
36196 0	Codificación	412	925	GAGUUUUCUGCAGUACUC	36	418
36196 1	Codificación	412	1075	CCAGUUUCUUAUUUGUUG	21	419
36196 2	Codificación	412	1096	AAACUUUUUGCUGCAACUC	66	420
36196 3	Codificación	412	1171	UUAAGUUUCUAAACAGCUC	87	421

Inhibición de ARNm de STAT3 humana por sARNds en células A549						
Isis #	Región	SEQ Objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
36196 4	Codificación	412	1314	AAUUUUUAAGCUGAUAAUUC	66	422
36196 5	Codificación	412	1337	GAGUCUUUGUCA AUGCACA	63	423
36196 6	Codificación	412	1424	UUGUUGGAUUCUCCAUGU	59	424
36196 7	Codificación	412	1593	GUGGGUCUCUAGGUCAAUC	38	425
36196 8	Codificación	412	1605	AACUGGCAAGGAGUGGGUC	30	426
36196 9	Codificación	412	1843	CUGAAUAAUUCACACCAGG	33	427
36197 0	Codificación	412	1867	AUUUAGCCCAUGUGAUCUG	58	428
36197 1	Codificación	412	1877	UCUUUGCAAAAUUAGCCC	52	429
36197 2	Codificación	412	1888	CAGCCAUGUUUUCUUUGCA	24	430
36197 3	Codificación	412	1934	AGGUCAAUGAUUUGUCCA	45	431
36197 4	Codificación	412	1944	CUUUUUCACAAGGUCAAUG	53	432
36197 5	Codificación	412	1954	CCAGGAUGUACUUUUUCAC	39	433
36197 6	Codificación	412	2057	UCACUGAAUCUUAGCAGGA	20	434
36197 7	3'UTR	412	2681	AAAGAUAGCAGAAGUAGGA	83	435
36197 8	3'UTR	412	3010	UUUGGAUGUCAGCAAGGUU	76	436
36197 9	3'UTR	412	3075	CCCUUUAAUUGUUAUUUU	0	437
36198 0	3'UTR	412	3501	GGGAUUUAUAAAUAUACCA	25	438
36198 1	3'UTR	412	3625	AAUAAGUCUAUUUAUAAA	11	439
36198 2	3'UTR	412	3645	GGCCAAUACAUUACAAAGG	42	440
36198 3	3'UTR	412	4010	UAUCACCAAGAAACUGGCU	42	441
36198 4	3'UTR	412	4080	GACUCAAGUUUAUCAGUAA	0	442
36198 5	3'UTR	412	4330	AAUCCACAGAAACUCUGA	47	443
36198 6	3'UTR	412	4350	UAAUUUGAUUUAAACAAACA	21	444
36198 7	3'UTR	412	4480	UAUGUACUGAAGAGUGUUG	62	445
36198 8	3'UTR	412	4520	UCUCACCUUUCUAAUAUU	44	446
36198 9	3'UTR	412	4630	AAGACCAGAUACAUGCUAC	69	447
36199 0	3'UTR	412	4650	CUUUUGCUACAAUCAGAGU	38	448
36199 1	3'UTR	412	4790	CCACCUUAUAGGUAGGUAA	38	449
36199 2	3'UTR	412	4840	GAAGUACACAUUGGAAUUU	53	450
36199 3	3'UTR	412	4930	UGGAAGUUAAGUAGAUAC	57	451
36199 4	3'UTR	412	4956	UACGGUCCUAUAUAACGU	45	452

Estos datos demuestran que los sARNds direccionados a STAT3 humana reducen la expresión de ARNm en células A549. Los sARNds que comprende las cadenas antisentido de SEQ ID NOs 417, 418, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 431, 432, 433, 435, 436, 440, 441, 443, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451 y 452 y sus complementos demostraron al menos una inhibición del 30% de STAT3 en este ensayo.

Ejemplo 25

Apoptosis en líneas celulares de carcinoma de pulmón después de inhibición con antisentido de STAT3 humana

Los oligonucleótidos antisentido direccionados hacia STAT3 humana fueron probados en cuanto a sus efectos sobre la apoptosis en células A549 y H460, las dos líneas celulares de carcinoma de pulmón.

- 5 Las células A549 fueron obtenidas y cultivadas como se describió aquí. La línea celular de carcinoma de pulmón H-460 fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) y cultivadas en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10%, 100 unidades/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (medios y suplementos de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Ambos tipos fueron sembrados a una densidad de 10,000 células por pozo en placas de 96 pozos.
- 10 Las células fueron tratadas con oligonucleótidos antisentido mezclados con LIPOFECTIN™, a una concentración de 3 µg/mL de LIPOFECTIN™ por 100 nM de oligonucleótido. Las concentraciones de oligonucleótido fueron 10, 20, 40 y 80 nM. La ISIS 29848 (NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN, donde N = A, T, C o G; SEQ ID NO: 453) es una secuencia aleatoria y fue utilizada como control negativo. Las células no tratadas sirvieron como control contra el cual fueron normalizados los datos. Las células fueron transfectadas con oligonucleótidos antisentido y los niveles
- 15 de ARNm de STAT3 fueron medidos 24 horas después del tratamiento mediante PCR en tiempo real usando PP2033.

- Para evaluar los efectos de la inhibición antisentido de STAT3 sobre la apoptosis, se llevó a cabo un ensayo de caspasa 24 y 48 horas después del tratamiento con oligonucleótido antisentido. La actividad de la caspasa 3 fue evaluada con un ensayo fluorométrico HTS Caspasa-3 (Catálogo #HTS02; EMD Biosciences, San Diego, CA) que
- 20 detecta la escisión después de residuos de aspartato en la secuencia de péptidos DEVD. El sustrato DEVD es marcado con una molécula fluorescente, la cual exhibe un desplazamiento de azul a verde en fluorescencia tras la escisión con caspasa-3. La caspasa-3 activa en las células tratadas con el compuesto oligomérico fue medida mediante este ensayo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del tratamiento con oligonucleótido antisentido, se agregaron 50 µL de regulador de prueba que contenían ditiotreitol 10 M a cada pozo, seguido por la
- 25 adición de 20 µL del conjugado del sustrato fluorescente de caspasa-3. La fluorescencia en los pozos fue detectada inmediatamente (excitación/emisión 400/505 nm) utilizando un lector de placas fluorescentes (SpectraMAX™ GeminiXS™, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La placa fue cubierta e incubada a 37°C durante 3 horas adicionales, después de lo cual se midió de nuevo la fluorescencia (excitación/emisión, 400/505 nm). El valor en tiempo cero fue sustraído de la medición obtenida a las 3 horas. La medición obtenida de las células de control no
- 30 tratada fue designada como 100% de actividad. La actividad de la caspasa-3 en células tratadas con los compuestos oligoméricos fue normalizada con respecto a la de las células de control no tratadas. Los valores de actividad de caspasa por encima o por debajo de 100% fueron considerados como indicativos de que el compuesto tiene la habilidad de estimular o inhibir la actividad de la caspasa, respectivamente.

- La apoptosis también fue evaluada detectando la escisión de la poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) en células
- 35 A549 y H460, las cuales fueron sembradas a 250,000 células por pozo en 6 pozos tratados con 150 nM de oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 humana. La proteína fue aislada 48 horas después del tratamiento con oligonucleótido y sometida a análisis por transferencia Western. Se detectó PARP con un anticuerpo comercialmente disponible (Cell Signaling, Beverly, MA), seguido por detección con ECLplus™ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La señal fue detectada con un Chemidoc™ EQ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se cuantificaron tanto el PARP como de longitud completa como el PARP escindido.
- 40

- La apoptosis fue evaluada adicionalmente por la medición de la hipodiploidía en células A549 y H460, las cuales fueron sembradas a 50,000 células por pozo en placas de 24 pozos y tratadas con 20, 80 y 150 nM de oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 humana. La ISIS 226844 (GCCCTCCATGCTGGCACAGG, SEQ
- 45 ID NO: 454) no direcciona a STAT3 y fue utilizada como control negativo. La ISIS 183891 (CCGAGCTCTCTTATCAACAG, SEQ ID NO: 455) es direccionada hacia la inhibición similar quinesina 1 de lo cual resulta una detención en el ciclo celular, y se utilizó como control positivo una dosis de 100 nM. Las células fueron recolectadas 48 horas después del tratamiento y se usaron procedimientos de rutina para preparar células para análisis por citometría de flujo. Las células fueron sometidas a tinción con yoduro de propidio para generar un perfil de ciclo celular utilizando un citómetro de flujo. El perfil de ciclo celular fue analizado con el programa ModFit
- 50 (Verity Software House, Inc., Topsham ME). La fragmentación de ADN nuclear es un hito de la apoptosis y un produce un incremento en células con un contenido de ADN hipodiploide, las cuales se categorizan como "subG1". Un incremento en células en la fase G1 es indicativo de una detención del ciclo celular antes de la entrada en la fase S; un incremento en células en la fase S es indicativo de la detención del ciclo celular durante la síntesis de ADN; y un incremento en células en la fase G2/M es indicativo de detención del ciclo celular justo antes o durante la mitosis.
- 55 Las células aneuploide (A) tienen un contenido de ADN superior a las de las células diploides. Los perfiles del ciclo celular de las células tratadas con compuestos oligoméricos fueron normalizados con respecto a los de las células de control no tratadas. Los valores por encima o por debajo de 100% fueron considerados como indicativos de un incremento o disminución, respectivamente, en la proporción de células que tienen un contenido de ADN de la etapa del ciclo celular indicada.

5

Los datos de estos ensayos en células A549 se muestran en las siguientes Tablas. Los niveles de ARNm de STAT3 en células A549 se muestran en la Tabla 36 como porcentaje de la expresión de ARNm con relación a células de control no tratadas. La actividad de caspasa-3 a 24 y 48 horas después del tratamiento con oligonucleótidos se presenta en la Tabla 37 como porcentaje de las células de control no tratadas. La cuantificación de PARP se muestra en la Tabla 38 como un porcentaje con respecto a las células de control no tratadas. Los perfiles de ADN se muestran en la Tabla 39, como porcentaje en cada fase del ciclo celular.

Tabla 36

Inhibición antisentido de STAT3 en células A549					
		% de control			
		Dosis de oligonucleótidos (nM)			
ISIS #	SEQ ID NO	10	20	40	80
106707	58	37	40	27	26
113176	115	42	35	21	16
113196	135	2	1	1	2
337332	246	24	3	5	18
337333	247	17	16	16	17
337348	262	44	19	10	12
345778	326	8	12	9	14
345781	329	6	1	2	8
345785	333	7	4	4	9
29848	453	76	75	71	70
129987	404	62	58	49	41

Tabla 37

Actividad de caspasa-3 después de inhibición antisentido de STAT3 en células A549									
	Actividad de caspasa-3, % de control 24 horas					Actividad de caspasa-3, % de control 48 horas			
ISIS #	Dosis de oligonucleótidos (nM)					Dosis de oligonucleótidos (nM)			
	10	20	40	80		10	20	40	80
106707	54	60	70	64		67	73	83	71
113176	77	87	88	83		56	38	124	125
113196	76	108	97	93		165	506	674	597
337332	155	243	195	208		494	1782	1608	766
337333	52	70	63	102		118	121	147	200
337348	39	51	72	66		73	82	2167	2649
345778	31	34	45	70		146	134	124	207
345781	220	258	240	279		1917	2766	3434	3428
345785	69	84	90	97		516	889	1307	1364
226844	86	81	78	75		153	400	2114	843
29848	72	70	85	68	16	18	8	14	
129987	58	52	66	66	67	61	53	61	

Tabla 38

PARP de longitud completa y escindido después de inhibición antisentido de STAT3 en células A549		
	PARP % de control	
ISIS #	Longitud completa	Escindida
106707	89	104
113176	87	97
113196	8	2171
337332	6	2532
337333	11	1828
337348	16	975
345778	7	665
345781	2	823
345785	1	313
29848	84	127
129987	106	119

TABLA 39

Perfiles de ADN después de inhibición antisentido de STAT3 en células A549						
		Perfiles ADN % de células por perfil				
Tratamiento	Concentración oligonucleótido (nM)	Sub G1	G1	G1/S	G2/M	A
UTC	Ninguno	0	51	29	20	13
UTC	Ninguno	0	49	32	19	14
106707	20	0	51	30	19	15
	80	0	53	28	18	17
	150	0	55	26	20	17
113176	20	0	54	28	18	16
	80	0	54	29	17	16
	150	5	53	29	18	15
113196	20	3	50	28	22	12
	80	34	67	21	13	7
	150	32	63	23	14	4
337332	20	10	47	29	24	10
	80	39	67	18	16	3
	150	42	69	18	13	5
337333	20	0	52	29	20	12
	80	22	56	30	14	7
	150	20	57	25	18	8

Perfiles de ADN después de inhibición antisentido de STAT3 en células A549						
Tratamiento	Concentración oligonucleótido (nM)	Perfiles ADN % de células por perfil				
		Sub G1	G1	G1/S	G2/M	A
337348	20	0	54	28	19	16
	80	1	51	30	19	16
	150	27	53	24	23	12
345778	20	1	51	26	23	14
	80	25	63	21	16	5
	150	30	60	24	16	5
345781	20	20	47	28	25	13
	80	43	62	27	11	5
	150	39	61	30	9	5
345785	20	3	50	27	23	14
	80	33	61	18	21	8
	150	32	59	23	18	7
29848	20	0	52	30	18	16
	80	0	52	30	17	15
	150	2	58	22	20	12
129987	20	0	52	29	19	15
	80	0	49	31	20	16
	150	0	54	28	18	16
183891	100	2	7	7	86	11

Es evidente a partir de estos datos que la inhibición antisentido de STAT3 dio como resultado la apoptosis en células A549, medida por 3 ensayos diferentes. Como ejemplo, el tratamiento con ISIS 345781 a 20 nM, el cual inhibió la expresión de ARNm de STAT3 tanto como en 99% (Tabla 36), e incrementó dramáticamente la actividad de la caspasa-3 a 48 horas hasta un nivel de aproximadamente 30 veces mayor (Tabla 37) que el observado con el control no tratado. Adicionalmente, el PARP de longitud completa fue reducido a 2% del control, y el PARP escindido fue aproximadamente 8 veces el del control (Tabla 38). Adicionalmente, la población subG1 de las células tratadas con ISIS 345781 fue aproximadamente 20 veces mayor que el control (Tabla 39), indicando que ocurrió fragmentación del ADN. En general, la distribución de las células en otras fases del ciclo celular, subG1, G1, G1/S y G2/M, no cambio marcadamente. La ISIS 337332 produjo un incremento en la población de G1 en las dosis de 80 y 150 nM, lo cual es indicativo de una detención del ciclo celular G1. Juntos, estos datos demuestran claramente que la inhibición antisentido de STAT3 por ISIS 345781 induce la apoptosis en células A549. Otros tratamientos con oligonucleótidos antisentido causaron de la misma manera un descenso en la expresión de STAT3 concomitante con una inducción de la apoptosis.

Los datos a partir de los ensayos PCR en tiempo real, caspasa-3, PARP y perfil de ADN en células H-460 se muestran en las siguientes tablas. Los niveles de ARNm de STAT3 en células H-460 se muestran en la Tabla 40 como porcentaje de la expresión de ARNm con respecto a células de control no tratadas. La actividad de caspasa-3 a 24 y 48 horas después del tratamiento con oligonucleótidos se presente en la Tabla 41 como porcentaje de células de control no tratadas. La cuantificación de PARP se muestra en la Tabla 42 como porcentaje con respecto a las células de control no tratadas. Los perfiles de ADN se muestran en la Tabla 43 como porcentaje en cada fase del ciclo celular.

Tabla 40

Inhibición antisentido de STAT3 en células H-460					
		% de control			
		Dosis de oligonucleótidos (nM)			
ISIS #	SEQ IDE NO	10	20	40	80
106707	58	49	49	33	30
113176	115	52	50	22	17
113196	135	12	4	4	6
337332	246	21	18	12	15
337333	247	26	20	14	22
337348	262	41	25	16	12

Inhibición antisentido de STAT3 en células H-460					
		% de control			
		Dosis de oligonucleótidos (nM)			
345778	326	11	7	8	9
345781	329	13	6	5	9
345785	333	15	8	7	15
29848	453	85	83	85	68
129987	404	53	61	65	48

Tabla 41

Actividad de caspasa-3 después de inhibición antisentido de STAT3 en células H-460									
	Actividad de caspasa-3, % control 24 horas					Actividad de caspasa-3, % control 48 horas			
ISIS #	Dosis de oligonucleótidos (nM)					Dosis de oligonucleótidos (nM)			
	10	20	40	80		10	20	40	80
106707	83	81	70	83		37	24	27	57
113176	97	85	80	143		37	44	121	235
113196	241	291	285	264		101	130	163	140
337332	132	416	431	487		205	364	399	393
337333	84	84	88	87		93	113	111	116
337348	55	54	71	125		58	62	297	440
345778	65	83	91	119		111	125	139	170
345781	218	361	426	493		509	586	630	654
345785	76	84	112	154		210	237	279	313
226844	84	78	128	138		81	89	293	269
29848	112	86	90	92	59	41	46	55	
129987	98	93	76	96	85	67	75	87	

Tabla 42

Escisión de PARP después de inhibición antisentido de STAT3 en células H-460		
	PARP % de control	
ISIS #	Longitud completa	Escindida
106707	188	146
113176	144	112
113196	14	47
337332	29	97
337333	36	120
337348	74	247
345778	30	100
345781	4	13
345785	43	143
29848	129	100
129987	165	128

Tabla 43

Perfiles de ADN después de inhibición antisentido de STAT3 en células H-460						
		Perfiles ADN % de células por perfil				
Tratamiento	Concentración de oligonucleótidos (Nm)	Sub G1	G1	G1/S	G2/M	A
UTC	Ninguno	2	52	31	17	16
UTC	Ninguno	1	50	33	18	17
106707	20	2	50	32	18	20
	80	1	51	32	17	19
	150	2	52	30	18	20
113176	20	2	50	33	18	21
	80	8	47	35	17	19
	150	18	49	24	27	13
113196	20	11	42	41	17	16
	80	32	46	39	15	9
	150	27	47	37	16	11
337332	20	13	44	40	16	15
	80	28	41	45	15	7
	150	28	43	45	13	7
337333	20	7	42	40	17	18
	80	15	43	40	17	14
	150	14	43	41	15	14
337348	20	2	56	27	16	23

Perfiles de ADN después de inhibición antisentido de STAT3 en células H-460						
Tratamiento	Concentración de oligonucleótidos (Nm)	Perfiles ADN % de células por perfil				
		Sub G1	G1	G1/S	G2/M	A
	80	11	46	38	16	19
	150	7	47	37	16	19
345778	20	22	49	35	16	12
	80	20	48	36	15	11
	150	13	44	40	15	17
345781	20	25	41	39	20	10
	80	26	43	39	18	8
	150	8	48	38	15	18
345785	20	22	47	39	14	10
	80	20	48	37	15	15
	150	2	49	34	17	19
29848	20	3	47	35	19	18
	80	10	41	41	17	15
	150	2	49	33	19	20
129987	20	2	50	32	18	21
	80	2	49	32	19	19
	150	16	17	44	39	16
183891	100	2	52	31	17	16

La inhibición antisentido de STAT3 en células H-460 indujo la apoptosis. Por ejemplo, el tratamiento con 20 nm de ISIS 345785 inhibió la expresión de STAT3 en aproximadamente 92% (Tabla 40). Esta reducción en la expresión objetivo fue acompañada por un incremento de aproximadamente 2.4 veces en la actividad de caspasa-3 (Tabla 41), con respecto al control no tratado. El PARP de longitud completa fue reducida a 43% del control, mientras que el PARP escindido se incremento a 143% del control (Tabla 42). Además, la hipodiploidía en células tratadas con 20 nM de ISIS 345785 fue incrementada aproximadamente 4 veces con respecto a las células de control (Tabla 43). Así, la inhibición antisentido de STAT3 por ISIS 3456785 en células H-460 dio como resultado la inducción de apoptosis. Otros tratamientos de oligonucleótidos antisentido causaron de la misma manera un descenso en la expresión de STAT3 concomitante con una inducción de apoptosis.

Además de inducir la apoptosis, la inhibición antisentido de STAT3 por ISIS 113176 dio como resultado una detención de la fase S, indicando que se bloqueó la replicación de ADN.

Ejemplo 26

Inhibición de STAT3 y crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de ALCL

Ratones transgénicos NPM-ALK desarrollaron espontáneamente linfomas de células T y tumores de células plasmáticas (Chiarle et al., Blood, 2003, 101, 1919-1927). Así, se utilizan como modelos *in vivo* de linfoma de células grandes anaplásicas (ALCL) y mieloma múltiple, estando los dos asociados con la activación de STAT3. Adicionalmente, cuando las células de los linfomas de células T y tumores de células de plasmas son inyectadas en ratones receptores, se desarrollan tumores subcutáneos en los ratones receptores. Los linfomas de células T y tumores de células de plasma trasplantados sirven como modelos animales para ALCL y mieloma múltiple, respectivamente.

Los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 fueron probados en cuanto a sus efectos sobre la expresión de STAT3 y el crecimiento tumoral en ALCL *in vivo*. Aproximadamente 2×10^6 células derivadas de tumores de células T de ratón NPM-ALK fueron inyectadas en ratones singenéticos (genéticamente idénticos). 7 días después de

la inyección de las células tumorales, los ratones recibieron diariamente inyecciones subcutáneas de ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) o un oligonucleótido de control no coincidente de 3 bases ISIS 28084 (SEQ ID NO: 151) a una dosis de 20 mg/kg. Los oligonucleótidos fueron administrados durante 14 días a seis animales por tratamiento con oligonucleótido. Los oligonucleótidos fueron inyectados subcutáneamente de manera contralateral a los lados del tumor. Los volúmenes tumorales fueron medidos diariamente y se muestran en la Tabla 44.

Tabla 44

Volumen tumoral en un modelo de ALCL : células de ratón NPM-ALK		
	Volumen tumoral mm ³	
Día de tratamiento	STAT3 ASO	Oligo de control
1	30	30
2	30	80
3	50	500
4	90	1300
5	110	1480

Se observó un mínimo o ningún crecimiento tumoral en animales tratados con ISIS 17152. Por el contrario, en animales tratados con el oligonucleótido de control, se desarrollaron grandes masas tumorales en todos los 5 animales al cabo de los 14 días de inyección de las células tumorales. La proteína STAT3 fue medida por transferencia Western como se describió aquí utilizando un anticuerpo monoclonal STAT3 (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA), el cual fue detectado con un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). La proteína STAT3 se redujo en el tumor así como en el hígado de los animales tratados con ISIS 17152. Adicionalmente, el examen histológico de la masa tumoral residual reveló que además de ser sustancialmente más pequeños, los tumores de los animales tratados con ISIS 17152 desplegaron áreas significativas de necrosis y muerte celular individual.

Se llevó a cabo un experimento similar *in vivo* en el cual aproximadamente 1×10^7 células tumorales NPM-ALK humanas (provistas por Dr. A. Lorenzana, Van Eslander Cancer Center, Gross Pointe Woods, MI) fueron inyectadas en ratones inmunocomprometidos. Este estudio fue llevado a cabo tal como se describió para la células de ratón NPM-ALK, utilizando ISIS 113176 (SEQ ID NO: 115) o un oligonucleótido de control no coincidente (129987, SEQ ID NO: 404) a 20 mg/kg. Los oligonucleótidos fueron inyectados subcutáneamente de manera contralateral a los lados del tumor. Los oligonucleótidos fueron administrados durante 14 días a grupos que contenían 3 animales cada uno. Los volúmenes tumorales fueron medidos y se muestran en la Tabla 44.

Tabla 44

Volumen tumoral en un modelo de ALCL utilizando células NPM-ALK humanas		
	Volumen tumoral mm ³	
Día de tratamiento	STAT3 ASO	Oligo de control
0	50	50
2	100	100
4	100	240
6	100	520
8	260	1310
10	330	2670
12	360	3140
14	790	4810

Se observó mínimo o ningún crecimiento de tumores en animales tratados con ISIS 113176. Por el contrario, se observó crecimiento tumoral en animales inyectados con un oligonucleótido de control no coincidente. Estos datos demuestran que la inhibición antisentido de STAT3 inhibe la expresión de proteína de STAT3 en tumores e inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de ALCL. Estos hallazgos demuestran que la inhibición de STAT3 es una metodología terapéutica en el tratamiento de ALCL humano.

Ejemplo 27

Inhibición de crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de mieloma múltiple

Las células de mieloma múltiple derivadas de ratones transgénicos NPM-ALK, que se caracterizan por la presencia de STAT3 activada constitutivamente, fueron inyectados por vía subcutánea en ratones singénicos, los ratones recibieron inyecciones subcutáneas diarias de ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) o un oligonucleótido de control no coincidente (SEQ ID NO: 151) a una dosis de 20 mg/kg. Los oligonucleótidos fueron administrados durante 14 días. Los oligonucleótidos fueron inyectados subcutáneamente de manera contralateral a los lados del tumor. Los volúmenes tumorales fueron medidos cada 2 días y se muestran en la Tabla 45.

Tabla 45

Volumen tumoral en un modelo de ALCL usando células NPM-ALK humanas		
	Volumen tumoral nm ³	
Día de tratamiento	STAT3 ASO	Oligo de control
0	80	170
2	80	830
4	80	1170
6	170	1670
8	250	3500
10	500	6670
12	500	8580
14	1170	11000
16	1330	13670

Como se muestra en la Tabla 45, la ISIS 17152, direccionada a STAT3 inhibió el crecimiento tumoral en este modelo, mientras que el oligonucleótido de control no lo hizo. Estos datos demuestran que la inhibición antisentido de STAT3 evita el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de mieloma múltiple.

Ejemplo 28

Efectos de la inhibición antisentido de STAT3 en líneas celulares ALCL

La inhibición antisentido de STAT3 fue evaluada en cuanto a sus efectos sobre el crecimiento celular y supervivencia en células ALCL humanas (células TS ALCL o células SU-DHL, provistas por el Dr. A. Lorenzana, Van Eslander Cancer Center, Gross Pointe Woods, MI). Las células TS ALCL fueron transfectadas con 0.02, 0.3, 1.5, 3, 6, 12 y 15 M de ISIS 113176 (SEQ ID NO: 115) o la ISIS no coincidente de 3 bases 129987 (SEQ ID NO: 404) por electroporación. Se sometieron a electroporación 2×10^6 células utilizando una unidad de electroporación Amaxa[®] (Amaxa Biosystems, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de 24 horas, se recolectaron las células. La viabilidad celular fue evaluada por tinción con azul de tripano, la cual es tomada solamente por células no saludables o muertas. La viabilidad celular y la proteína de STAT3 no se redujeron en células tratadas con el control no coincidente. Sin embargo, las células tratadas con ISIS 113176 desplegaron una reducción dependiente de la dosis en la viabilidad celular, la cual fue 97%, 87%, 67%, 60% y 29% del control a dosis de 0.03, 1.5, 3, 6 y 12 M. la viabilidad celular fue reducida al 36% del control en células que recibieron una dosis 15 M de ISIS 113176. Además de una reducción en la viabilidad celular, la transferencia Western de células tratadas, llevada a cabo como se describió aquí, reveló que la expresión de la proteína de STAT3 disminuyó de una manera dependiente de la dosis.

La incorporación de timidina tritiada en ADN recién sintetizado sirve como una medida de la proliferación celular. El crecimiento celular después de la inhibición antisentido de STAT3 fue evaluado midiendo la cantidad de timidina tritiada (^3H) incorporada en las células transfectadas con ISIS 113176 (SEQ ID NO: 115). Las células SU-DHL fueron transfectadas con 7 μM de ISIS 113176. Las células fueron transfectadas con un STAT3 constitutivamente activado, STAT3c, el cual tiene una sustitución de aminoácidos que hace que la STAT3 espontáneamente dimérica, se enlace al ADN y active la transcripción (Bromberg, J.F., et al., Cell, 1999, 98, 295-303). Las células fueron cultivadas en la presencia de 1 Ci de ^3H -timidina durante las últimas 18 horas de cultivo. 24, 48 y 72 horas después del tratamiento con oligonucleótido, las células fueron recolectadas. La incorporación de ^3H -timidina fue medida por recuento de centelleo de rutina y se muestra como conteo por minuto (CPM) en la Tabla 46. Se usaron células Jurkat (las cuales pueden ser obtenidas de ATCC, Manassas, VA) como control para células no afectadas por la activación o inhibición de STAT3.

Tabla 46

Proliferación celular reducida después de inhibición antisentido en células ALCL humanas				
		^3H -timidina incorporado, CPM		
		Tiempo después de transfección (horas)		
Tipo celular	Tratamiento	24	48	72
SU-DHL	ISIS 113176	770	1530	1680
	STAT3c	2000	3150	3590
	No tratado	1350	2530	3090
Jurkat	ISIS 113176	2670	5330	8000
	STAT3c	1560	3780	5940
	No tratado	1940	3830	6440

Como se muestra en la Tabla 46, la inhibición antisentido en células SU-DHL humanas inhibe marcadamente la proliferación celular. Las células Jurkat, las cuales no expresan STAT3 activado constitutivamente, no fueron afectadas por el tratamiento con oligonucleótido antisentido. Así, los efectos de la proliferación celular son específicos para la inhibición antisentido de STAT3.

En un ensayo similar, se transfectaron células TS ALCL con 7 μM de ISIS 113176. La expresión de STAT3 y la escisión de PARP fueron evaluadas por transferencia Western 24, 48 y 72 horas después del tratamiento con oligonucleótido, usando procedimientos descritos aquí. La expresión de la proteína de STAT3 fue reducida y la escisión de PARP, un indicador de la apoptosis, fue observada, ocurriendo ambas de una forma dependiente del tiempo. El crecimiento celular fue evaluado midiendo la incorporación de ^3H -timidina en estas células.

Tabla 47

Proliferación celular reducida después de inhibición antisentido de STAT3 en células TS ALCL			
	^3H -timidina incorporada, CPM		
	Tiempo después de transfección (hora)		
Tratamiento	24	48	72
ISIS 113176	770	1530	1680
STAT3c	2000	3150	3590
No tratada	1350	2530	3090

Estos datos demuestran que la inhibición antisentido de STAT3 redujo la proliferación celular en células de linfoma anaplásico

Ejemplo 29

Efectos de oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 en ratones normales: selección de toxicidad

Los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 fueron evaluados en cuanto a sus efectos en ratones normales. Ratones C57B1/6 fueron inyectados subcutáneamente con una dosis de 50 mg/kg de oligonucleótido, dos veces a la semana durante un periodo de 4 semanas. Los oligonucleótidos antisentido de STAT3 administrados fueron ISIS 337332, ISIS 337333, ISIS 345778, ISIS 345781, ISIS 113196, ISIS 345815, ISIS 345794, o ISIS 345823. La ISIS 335099 (GAGTATCACTATGGCTGGCC, SEQ ID NO: 456) no direcciona a STAT3 y fue utilizada como oligonucleótido de control. Los animales que recibieron inyecciones salinas fueron usados también como grupo de control. Cada grupo de tratamiento contenía 5 animales. Se recolectaron muestra de sangre antes del tratamiento (Wk0) y después de 2 (Wk2) y 4 (Wk4) semanas de tratamiento. Se midieron la glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre por análisis clínico de rutina. Estos datos se muestran en la Tabla 48.

Tabla 48

Efecto de oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 en glucosa, triglicéridos y colesterol en plasma en ratones normales										
Tratamiento	SEQ ID NO	Glucosa (mg/dL)			Triglicéridos (mg/dL)			Colesterol (mg/dL)		
		Wk 0	Wk 2	Wk 4	Wk 0	Wk 2	Wk 4	Wk 0	Wk 2	Wk 4
Solución salina	n/a	175	206	192	112	70	124	68	65	73
113196	135	165	185	192	87	75	62	67	69	54
337332	246	170	184	217	110	59	64	75	115	10 3
337333	247	180	177	213	93	81	71	72	52	55
345778	326	168	182	187	133	104	89	73	62	55
345781	329	186	180	190	102	58	71	77	149	12 1
345794	342	186	193	201	81	100	84	81	91	94
345815	363	178	175	157	87	154	108	81	142	17 8
345823	370	183	194	239	123	99	106	81	81	96

Las transaminasas de hígado ALT y AST, cuyos incrementos pueden indicar toxicidades, también fueron medidas en sangre por análisis clínicos de rutina. Estos datos se muestran la Tabla 49

Tabla 49

Efecto de oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 sobre niveles de transaminasa en hígado en ratones normales							
Tratamiento	SEQ ID NO	ALT (IU/L)			ALT (IU/L)		
		Wk 0	Wk 2	Wk 4	Wk 0	Wk 2	Wk 4
Solución salina	Ninguno	39	30	33	57	44	64
113196	135	33	49	76	48	52	109
337332	246	34	191	123	48	168	159
337333	247	32	43	44	50	53	60
345778	326	36	44	102	47	53	106
345781	329	32	223	204	43	170	211
345794	342	30	34	48	40	40	63
345815	363	31	48	85	45	47	81
345823	370	33	37	44	44	44	57

Después de 4 semanas de tratamiento, los animales fueron sacrificados y se preparó su ARN a partir de tejido de hígado. La expresión del ARNm de STAT3 fue medida por PCR en tiempo real tal como se describió aquí. Los datos

se muestran en la Tabla 50 como porcentaje de inhibición de la expresión de ARNm con respecto a los ratones de control tratados con solución salina.

Tabla 50

Reducción de direccionamiento de STAT3 en hígado		
Tratamiento	SEQ ID NO	% de Inhibición
Control		0
113196	135	45
337332	246	75
337333	247	45
345778	326	45
345781	329	20
345794	342	55
345815	363	0
345823	370	35

- 5 Como se muestra en la Tabla 50, el tratamiento con ISIS 113916, ISIS 337332, ISIS 337333, ISIS 345778, ISIS 345794, e ISIS 345823 produjo una reducción del ARNm en STAT3 en hígado.

Los pesos del hígado, bazo, capa grasa y riñón fueron medidos al final del estudio. El peso de hígado promedio por cada grupo de tratamiento se da en la Tabla 51.

Tabla 51

Efecto de oligonucleótidos antisentido de STAT3 en el peso del hígado		
Tratamiento	SEQ ID NO	Peso (g)
Solución salina	n/a	1.3
113196	135	1.7
337332	246	1.5
337333	247	1.5
345778	326	1.8
345781	329	1.4
345794	342	1.7
345815	363	1.5
345823	370	1.5

- 10 Los pesos de la capa grasa para animales tratados con solución salina promedió aproximadamente 0.33 g. Los pesos de la capa grasa promedio para los grupos de tratamiento de ISIS 337333, ISIS 345778, ISIS 345815, ISIS 345794, o ISIS 345823 variaron desde aproximadamente 0.29 g a 0.36 g, y no fueron significativamente diferentes en comparación con los medidos para el grupo tratado con solución salina. El promedio para los pesos de la capa
- 15 grasa para animales tratados con ISIS 337333, ISIS 345781, e ISIS 113196 fueron ligeramente inferiores a los controles tratados con solución salina en aproximadamente 0.23 g, 0.22 g, y 0.26 g, respectivamente.

La medición de los pesos de bazo de los animales tratados con ISIS 337332, ISIS 337333, ISIS 345778, e ISIS 113196 dieron como resultado promedios entre aproximadamente 0.09 y 0.1 g, lo cual no difiere del promedio para

animales tratados con solución salina (aproximadamente 0.09 g). El peso de bazo promedio para animales tratados con ISIS 345815, ISIS 345794, o ISIS 345823 fue aproximadamente 0.08, 0.07, y 0.08, respectivamente. Así, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido que direccionan a STAT3 no produjo un incremento en los pesos en el bazo de ratones normales.

- 5 Los pesos promedio de riñón medidos para los grupos de tratamiento variaron desde aproximadamente 0.29 g hasta aproximadamente 0.34 g. En comparación con los pesos de riñón promedio medidos para controles tratados con solución salina (aproximadamente 0.36 g), estos datos indican que el tratamiento con oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 no produjo ningún incremento en el peso de riñón en ratones normales.

- 10 Los pesos corporales fueron medidos a la semana 0, 2 y 4. Los pesos corporales promedio medidos para los animales de control tratados con solución salina variaron desde aproximadamente 24 g a 27 g, y los animales mostraron una ganancia de peso con el tiempo. Los animales tratados con oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 mostraron incremento similares en el peso con el tiempo, y sus pesos promedios no variaron significativamente de aquellos de los animales de control.

- 15 El tratamiento de ratones normales con oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 humana no dio como resultado efectos adversos significativos.

Ejemplo 30

Evaluación de oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 como tratamiento para el cáncer.

- 20 La expresión y/o activación inapropiada de STAT3 está asociada con una variedad de cánceres, incluyendo cáncer de próstata, carcinomas de células escamosas de la cabeza y el cuello, carcinoma pulmonar de células no pequeñas y carcinoma hepatocelular, mieloma múltiple, linfomas de células grandes anaplásticas, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda y linfoma no Hodgkin. Así, los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 son evaluados en pacientes con tumores sólidos o enfermedades malignas hematológicas. Los grupos de tratamiento son de aproximadamente 30 a 40 pacientes. Durante un periodo de carga, los oligonucleótidos antisentido son administrados por vía intravenosa 3 veces en la primera semana, después de lo cual los oligonucleótidos antisentido son administrados semanalmente. Las dosis varían de 2 mg/kg a 10 mg/kg. Los efectos de tratamiento con oligonucleótidos antisentido son evaluados estableciendo la respuesta al tratamiento y midiendo los biomarcadores. Ejemplos de marcadores biológicos en pacientes con mieloma múltiple incluyen paraproteína en suero y apoptosis en células de mieloma múltiple circulantes. La proteína de STAT3 y la fosforilación también se miden en células de mieloma circulantes.

- 30 Los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 también son probados en pacientes que son refractarios a los agentes quimioterapéuticos o que experimentan una reaparición de un cáncer.

Los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 también son administrados solos o en combinación con otros agentes, por ejemplo, el agente quimioterapéutico Velcade®.

Ejemplo 31

- 35 Apoptosis en líneas celulares de carcinoma de pulmón después de inhibición antisentido de STAT3 humana

- 40 La citoquina IL6 es un regulador corriente arriba conocido de la función de STAT3 y también es sobreexpresado en células cancerosas de pulmón. Puesto que la STAT3 está implicada frecuentemente en la formación de tumores y en la supervivencia de células epiteliales, fue de interés delinear el papel de STAT3 en células de carcinoma pulmonar de células no pequeñas. Con este fin, se probó la inhibición antisentido de STAT3 para sus efectos sobre el crecimiento celular e inducción de apoptosis. Los ensayos fueron llevados a cabo como se describió (Song et al., Oncogene, 2003, 22, 4150-4165).

- 45 Las líneas celulares A549, H460, H358 y H1299, todas las cuales fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA), fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 5%, glutamina 2 mM y 1% de penicilina/estreptomycin (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células A549, H358 y H1299 exhibieron STAT3 activada constitutivamente.

- 50 Los oligonucleótidos fueron transfectados en células de cáncer pulmonar humanas usando bien sea liposomas encapsulados o electroporación. Las células A549, H358 y H1299 (100,000 - 200,000 células en una placa de 60 mm) fueron transfectadas con 500 nM de oligonucleótidos con 15 mg de LIPOFECTIN™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en 1.5 ml de medio OptiMEM™ (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células fueron incubadas con los oligonucleótidos durante 4 horas, la muestra fue retirada y las células fueron lavadas una vez con RPM y más suero bovino fetal al 5% y luego incubadas en medio de cultivo. Para las inmunoprecipitaciones, los ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética y microscopia, las células fueron recolectadas 24 horas después de la transfección. Para los ensayos Apo-BRDU™, las células fueron recolectadas a 48 horas después de la transfección.

Para la electroporación de las células H460, las células fueron cultivadas a aproximadamente $20 - 30 \times 10^6$ en número, tripsinizadas e incubadas con oligonucleótidos a una concentración final de $10 \mu\text{M}$. Las células fueron sometidas a electroporación en un sistema de electroporación Biorad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a $1000 \mu\text{F}$ y 230V en medio OPTI-MEM, Eagle en un volumen total de 400 mL . Las células fueron sembradas subsecuentemente en placas de 10 cm en RPMI con FBS al 5% y 1% de penicilina/estreptomicina y colocadas en una incubadora de CO_2 al 5% y 37°C durante la noche. La mañana siguiente las células fueron lavadas con PBS y se agregó nuevo medio con nuevo suero y antibióticos.

La apoptosis fue probada utilizando un kit Apo-BRDU™ (Pharmingen, BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron datos de $10,000$ células por condición experimental y se analizaron para fluorescencia en un FACScan™ Immunocytometry System usando el software CELLQuest™ (BD Biosciences, San José, CA). La apoptosis también fue detectada midiendo la escisión de la poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) la cual es indicativa de apoptosis, utilizando el anticuerpo PARP (Cell Signaling, Beverly, MA) para detectar PARP de longitud completa así como el fragmento grande escindido.

Los ensayos de enlazamiento de ADN de STAT fueron llevados a cabo como se describió previamente (Yu et al., Science, 1995, 269, 81-83; Garcia et al., Cell Growth Differ., 1997, 8, 1267-1276). Los complejos proteína-ADN fueron resueltos por electroforesis no desnaturizante en gel de poliacrilamida (PAGE) y detectados por autoradiografía. Los anticuerpos policlonales anti-STAT3 (C-20) usados para identificar complejos de STAT3 específicos por el ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnologies. Para uso en ensayos de superdesplazamiento, se incubó 1 g del anticuerpo C-20 con extracto nucleares durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de la sonda radiomarcada y la electroforesis.

Las inmunoprecipitaciones Western fueron llevadas a cabo como sigue. Los lisados celulares fueron normalizados en cuanto al contenido total de proteína (50 mg) y sometidos a SDS-PAGE. Los anticuerpo primarios utilizados en estos estudios consistieron de STAT3 (Transduction Laboratories, Lexington, KY), STAT3 Y705 fosforilado (Cell Signaling, Beverly, MA) PARP (Cell Signaling, Beverly, MA), y beta-actina (Sigma, St. Louis, MO). La detección de proteínas fue lograda utilizando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano y el kit de quimioluminiscencia potenciada (ECL) de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ).

Las células A549 fueron transfectadas sin oligonucleótidos, antisentido u oligonucleótidos no coincidente y después de 24 horas las células fueron recolectadas y se prepararon extractos de proteína total y nucleares. La transferencia Western reveló una reducción en el contenido total de proteína de STAT3 de las células por ISIS 113176, mientras que no se vio reducción en células tratadas con el oligonucleótido de control no coincidente o en células no tratadas. La reducción de los niveles de STAT3 fue acompañada por la activación de la apoptosis como lo evidencia la escisión de (PARP) tan pronto como en 24 horas después de la transfección, mientras que no se observó escisión de PARP en las células tratadas con el control no coincidente o no tratadas. Según se ensayo con EMSA, la inhibición antisentido de STAT3 dio como resultado una inhibición casi completa de la actividad de enlazamiento de ADN a STAT3, mientras que el tratamiento con oligonucleótidos no coincidentes no afectó la actividad de enlazamiento de ADN a STAT3. El examen fotomicroscópico de células tratadas con ISIS 113176 durante 48 horas reveló números reducidos y apariencia de tamaño y forma celular alterados con incremento acompañante en los residuos celulares y en células vacuoladas. Por el contrario, las células tratadas con el oligonucleótido de control no coincidente parecieron no tener cambios en el número de células, tamaño, forma ni en tener residuos celulares incrementados que sugieran muerte celular. Para proveer evidencia adicional para soportar el papel de STAT3 en el control de la apoptosis en células A549, las células fueron recolectadas y probadas en cuanto a fragmentación de ADN por incorporación de Apo-BrdU. Los resultados de los tres experimentos independientes fueron reunidos y se determinó el porcentaje de apoptosis por el porcentaje de células que incorporaron Apo-BrdU. Las células tratadas con oligonucleótidos antisentido de STAT3 tenían una incorporación de Apo-BrdU incrementada, aproximadamente 16 veces con respecto a la de las células tratadas con el control no coincidente y aproximadamente 48 veces la de las células de control no tratadas, resultados que son indicativos de la apoptosis. Las células no tratadas y las tratadas con control no coincidente tuvieron una evidencia mínima de ADN mellado. Por lo tanto, la inhibición antisentido de STAT3 indujo la apoptosis, según lo indica la escisión de PARP y la fragmentación de ADN, en células de carcinoma de pulmón A549.

Para extender los hallazgos con células A549, se llevaron a cabo experimentos similares con células de carcinoma de pulmón H358 y H1299. La inhibición antisentido de STAT3 dio como resultado la pérdida de la proteína de STAT3 en células tanto H358 como H1299 en comparación con tratamiento con el oligonucleótido de control no coincidente. La activación de rutas apoptóticas fue demostrada en células H358, evidenciadas por la escisión de PARP en células tratadas con ISIS 113176, mientras que no se vio evidencia de apoptosis en células H1299, a pesar de la proteína STAT3 ausente.

El efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido de STAT3 También fue establecido en células de carcinoma de pulmón H460 que tuvieron mínima actividad de enlazamiento de ADN de STAT3. Las células H460 fueron transfectadas con hasta 10 nM de ISIS 113176 o ISIS 129987 por electroporación. La actividad de STAT3 medida por EMSA mostró una mínima actividad de enlazamiento de ADN, la cual fue reducida por la inhibición

antisentido de STAT3 pero no por el tratamiento con el oligonucleótido de control no coincidente. No fueron evidentes efectos sobre la morfología celular o el número de células, la apoptosis no se incremento (0.53% y 0.27% de células apoptóticas después del tratamiento con ISIS 129987 e ISIS 113176, respectivamente), y no se observó incorporación incrementada de Apo-BrdU. Estos datos soportan la conclusión de que la inhibición antisentido de STAT3 es específica y no induce la muerte celular en células H460, las cuales tienen mínima actividad de STAT3.

A partir de estos datos, es evidente que la inhibición antisentido de STAT3 dio como resultado la apoptosis en células A549 y H358 mientras que no se vio observación de apoptosis en células H1299 o H460. Estos hallazgos demuestran que la inhibición directa de STAT3 lleva a la muerte celular apoptótica y sugiere que la STAT3 controla las rutas apoptóticas en ciertas células de cáncer pulmonar humano.

10 Ejemplo 32

Inhibición antisentido de STAT3 humana en células de cáncer de próstata

La patogénesis de mieloma múltiple involucra la activación de STAT3 por la citoquina IL-6, la cual evita la apoptosis. Obedeciendo a la asociación de citoquinas, incluyendo la IL-6, con el cáncer de próstata, se investigó la función de la STAT3 en células de cáncer de próstata. En una realización adicional, células DU145 sometidas a inhibición antisentido de STAT3 fueron evaluadas en cuanto a la actividad de STAT3, apoptosis y proliferación. Los procedimientos usados en estos ensayos fueron descritos en detalle por Mora, et al. (Cancer Research, 2002, 62, 6659-6666).

Las células de cáncer de próstata DU145 fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA) y fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal al 10%. Las células fueron tratadas con 250 nM de ISIS 113176 (SEQ ID NO: 115) o ISIS 129987 (GCTCCAATACCGTTGCTTC, SEQ ID NO: 404), un oligonucleótido de control no coincidente que no direcciona a STAT3. Las células fueron sembradas a una densidad de 2×10^6 células en una placa de 10 cm 18 horas antes de la transfección. Las células fueron transfectadas durante 3 horas con Lipofectamine™ Plus (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) sola, con Lipofectamine™ Plus e ISIS 113176 o con Lipofectamine™ Plus con ISIS 129987. Las células no tratadas sirvieron como control.

Después de 24 horas de tratamiento las células fueron recolectadas para aislar proteína y preparar el extracto nuclear. La actividad de enlazamiento de ADN de la STAT3 fue evaluada por el ensayo de desplazamiento por movilidad electroforética (EMSA) en extractos nucleares. Se incubaron 5 µg de proteína celular total con una sonda de oligonucleótido marcada con ^{32}P que se enlaza a las proteínas de STAT3 activadas. Los complejos proteína-ADN fueron resueltos por electroforesis en poliacrilamida no desnaturalizante y detectados por autorradiografía. Los niveles de proteína de STAT3 fueron evaluados por transferencia Western, utilizando un anticuerpo de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Las células transfectadas también fueron recolectadas y fijadas en etanol al 95% para la tinción inmunohistoquímica de STAT3 fosforilada, utilizando un anticuerpo policlonal humano de conejo (Phospho-Tyr705-Stat3; Cell Signaling, Beverly, MA).

La EMSA reveló una actividad de enlazamiento de ADN de STAT3 altamente disminuida en las células DU145 transfectadas con ISIS 113176, en comparación con las células de control (oligonucleótido de control no coincidente, Lipofectamine™ Plus solo o sin tratamiento). Un anticuerpo de STAT3 bloqueó y desplazó esta actividad de enlazamiento de ADN, confirmando que la actividad corresponde a STAT3. La expresión de la proteína STAT3 fue reducida grandemente en células DU145 transfectadas con ISIS 113176, en comparación con células de control. Adicionalmente, la tinción de STAT3 fosforilada fue abolida en células transfectadas DU145. Estos datos demuestran que la inhibición antisentido de STAT3 dio como resultado una reducción en los niveles de proteína de STAT3, incluyendo STAT3 fosforilada, y en la actividad de enlazamiento de ADN de STAT3.

La apoptosis en células DU145 de control y transfectadas fue evaluada midiendo los niveles de caspasa-3, usando un anticuerpo específico para caspasa-3 activada, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Becton Dickinson Pharmingen, San Diego, CA). La tinción fue analizada por citometría de flujo. La proliferación celular fue medida contando el número de células viables utilizando un hemocitómetro y exclusión por coloración con azul de tripano. Las caspasa-3 activada fue aproximadamente 5%, 7% y 18% de los controles no tratados en células que recibieron Lipofectamine™ Plus solo, ISIS 129987 o ISIS 113176, respectivamente, demostrando un incremento en la apoptosis después de la inhibición antisentido de STAT3. La proliferación celular también fue suprimida durante un periodo de 48 horas y no se elevó por encima de 3×10^6 células en muestras tratadas con ISIS 113176. El número de células tratadas con control no coincidente y Lipofectamine-Plus se incrementó durante el mismo periodo de 48 horas, a aproximadamente 5×10^6 y 9×10^6 células, respectivamente.

Ejemplo 33

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 de ratón con alas 2'-MOE y una brecha desoxi

De acuerdo con la presente divulgación, se diseñó una serie adicional de oligonucleótidos para direccionar a diferentes regiones de la STAT3 de ratón, utilizando secuencias publicadas (número de acceso GenBank® U06922, incorporada aquí como SEQ ID NO: 82, el complemento de los nucleótidos 12369484 a 12421464 de número de

- acceso GenBank® NT_039521.2, incorporada aquí como SEQ ID NO: 461; número de acceso GenBank® NM_213659.1, incorporada aquí como SEQ ID NO: 462; y número de acceso GenBank® NM_011486.3, incorporada aquí como SEQ ID NO: 463). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 52. "Sitio objetivo" indica el primer número de nucleótido (más cercano a 5') en la secuencia objetivo particular al cual se enlaza el oligonucleótido.
- 5 Todos los compuestos en la Tabla 52 son oligonucleótidos quiméricos ("oligómeros con brecha") de 20 nucleótidos de longitud, compuestos de una región "brecha" central consistente de diez 2'-desoxinucleótidos, la cual está flanqueada en ambos lados (direcciones 5' y 3') por "alas" de cinco nucleótidos. Las alas están compuestas de 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) nucleótidos. Los enlaces internucleósido (esqueleto) son fosforotioato (P=S) a lo largo del oligonucleótido. Todos los residuos de citidina son 5-metilcitidinas.
- 10 Los compuestos fueron analizados en cuanto a su efecto sobre los niveles de ARNm de STAT3 de ratón mediante PCR en tiempo real tal como se describió en otro ejemplo aquí. Los datos son promedio de 2 experimentos en los cuales las células b.END fueron tratadas con 75 nM de oligonucleótidos antisentido.
- La línea celular b.END endotelial de cerebro de ratón fue obtenida del Dr. Werner Risau en el Max Plank Institute (Bad Nauheim, Alemania). Las células b.END fueron cultivadas de manera rutinaria en DMEM, con alta glucosa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células fueron pasadas de rutina por tripsinización y dilución cuando alcanzaron aproximadamente 90% de confluencia. Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos (Falcon-Primaria #3872, BD Biosciences, Bedford, MA) a una densidad de aproximadamente 3000 células/pozo para uso en experimentos de transfección con compuestos oligoméricos.
- 15 Las sondas y cebadores para STAT3 de ratones fueron diseñadas para hibridar una secuencia de STAT3 de ratón, utilizando información de secuencia publicada (número de acceso GenBank® NMR_213659.1, incorporada aquí como SEQ ID NO: 462). Para STAT3 de ratón los cebadores de PCR fueron: cebador de avance: GCCACGTTGGTGTTTCATAATCT (SEQ ID NO: 464) cebador inverso: GATAGAGGACATTGGACTCTTGCA (SEQ ID NO: 465) y la sonda de PCR fue: FAM-TTGGGTGAAATTGACCAGCAATATAGCCG-TAMRA (SEQ ID NO: 466)
- 20 donde FAM es el colorante fluorescente y TAMRA es el colorante de detención.
- 25

Tabla 52

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 de ratón con alas 2'-MOE y una brecha desoxi						
Isis #	Región	SEQ ID NO Objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
106747	Codificación	82	2017	GCCCATGATGATTTTCAGCAA	70	58
133003	3' UTR	82	2527	AAAAAGTGCCCAGATTGCCC	76	99
337269	Codificación	82	339	TTCTCAAGATACCTGCTCTG	41	183
337270	Codificación	82	344	TTGGCTTCTCAAGATACCTG	76	184
337287	Codificación	82	627	TGGTTGTTTCCATTCAGATC	60	201
337289	Codificación	82	660	TCCAGCTGCTGCATCTTCTG	65	203
337294	Codificación	82	783	CTCTTCCAGTCAGCCAGCTC	51	208
337298	Codificación	82	873	AGTTGAGATTCTGCTAATGA	35	212
337299	Codificación	82	878	TCTGAAGTTGAGATTCTGCT	69	213
337302	Codificación	82	1110	TTGACCAGCAACCTGACTTT	30	216
337303	Codificación	82	1134	AGCTGATAATTCAACTCAGG	76	217
337304	Codificación	82	1139	TTTTAAGCTGATAATTCAAC	1	218
337317	Codificación	82	1412	CTAGGTCAATCTTGAGGCCT	50	231
337319	Codificación	82	1425	AAGGAGTGGGTCTCTAGGTC	9	233
337320	Codificación	82	1430	CTGGCAAGGAGTGGGTCTCT	55	234

ES 2 521 599 T3

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 de ratón con alas 2'-MOE y una brecha desoxi						
Isis #	Región	SEQ ID NO Objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
337322	Codificación	82	1457	TCTGACAGATGTTGGAGATC	32	236
337323	Codificación	82	1462	TGGCATCTGACAGATGTTGG	54	237
337328	Codificación	82	1686	CATGTGATCTGACACCCTGA	51	242
337329	Codificación	82	1691	TAGCCCATGTGATCTGACAC	52	243
337331	Codificación	82	1721	CCTTGCCAGCCATGTTTTCT	57	245
337332	Codificación	82	1726	GAAGCCCTTGCCAGCCATGT	77	246
337334	Codificación	82	1736	CCCAGAAGGAGAAGCCCTTG	47	248
337337	Codificación	82	1992	ATGTTGTTTCAGCTGCTGCTT	62	251
337338	Codificación	82	1997	ATGACATGTTGTTTCAGCTGC	77	252
337339	Codificación	82	2002	AGCAAATGACATGTTGTTCA	53	253
337340	Codificación	82	2007	ATTTTCAGCAAATGACATGTT	44	254
337341	Codificación	82	2012	TGATGATTTTCAGCAAATGAC	42	255
337342	Codificación	82	2022	TTATAGCCCATGATGATTTTC	10	256
337343	Codificación	82	2027	TGATCTTATAGCCCATGATG	70	257
337344	Codificación	82	2032	ATCCATGATCTTATAGCCCA	70	258
337375	3' UTR	82	2704	ACCAGGAGGCACTTGTCTAA	59	89
367289	Intrón	461	3664	CTTAATTCTTAGAGATCCAC	66	467
367290	Intrón 1	461	13469	CACACTAATGCAAGATGCTA	51	468
367291	Intrón	461	24761	AAAAAGTGATCTACCAACAG	25	469
367292	Exón 8: Intrón 8	461	34889	CAACTCTTACCAGTTTTCCA	0	470
367293	Codificación	82	2253	ATCAATGAATCTAAAGTGCG	18	471
367294	Codón de inicio	462	147	CACTGAGCCATCCTGCTGCA	50	472
367295	Codón de inicio	462	156	AGCTGGTTCCACTGAGCCAT	60	473
367296	Codificación	462	380	TGTGCTGATAGAGGACATTG	70	474
367297	Codificación	462	475	AGACTCTTCCCACAGGCATC	63	475
367298	Codificación	462	864	CAGTCAGCCAGCTCTTCATC	52	476
367299	Codificación	462	940	AGTTATCCAGTTTTCCAGAC	40	477
367300	Codificación	462	990	TCCAGTTTCTTAATTTGTTG	44	478
367301	Codificación	462	1016	TGTAGGACACTTTCTGCTGC	62	479
367302	Codificación	462	1169	ACTGGACACCAGTCTTGATG	14	480

Fosforotioato u oligonucleótidos quiméricos direccionados a STAT3 de ratón con alas 2'-MOE y una brecha desoxi						
Isis #	Región	SEQ ID NO Objetivo	Sitio objetivo	Secuencia	% inhibición	SEQ ID NO
367303	Codificación	462	1231	TTTAATTTTAAGCTGATAAT	0	481
367304	Codificación	462	1236	CACACTTTAATTTTAAGCTG	40	482
367305	Codificación	462	1241	CAATGCACACTTTAATTTTA	15	483
367306	Codificación	462	1300	GCCCAGAATGTTAAATTTCC	54	484
367307	Codificación	462	1379	CCCTAAGGGTCAGGTGCTTG	69	485
367308	Codificación	462	1398	CCATTCCACATCTCTGCTC	55	486
367309	Codificación	462	1458	AAGGTGATCAGGTGCAGCTC	44	487
367310	Codificación	462	1505	GGGTCTCTAGGTCAATCTTG	46	488
367311	Codificación	462	1525	CACCACAAGTGGCAAGGAGT	75	489
367312	Codificación	462	1588	GGTCAGCATGTTATACCACA	69	490
367313	Codificación	462	1647	ACTTGGTCCCAGGTTCCAAT	54	491
367314	Codificación	462	1763	GACACCCTGAGTAGTTCACA	58	492
367315	Codificación	462	1803	CCAGCCATGTTTTCTTGCA	50	493
367316	Codificación	462	1842	ATGATATTGTCTAGCCAGAC	49	494
367317	Codificación	462	1868	CCAAGATATACTTTTTCACA	30	495
367318	Codificación	462	1883	CTTCATTCCAAAGGGCCAAG	23	496
367319	Codificación	462	2005	CCAAGTGAAAGTGACCCCTC	25	497
367320	Codificación	462	2023	ACTGATGTCCTTTTCCACCC	50	498
367321	Codificación	462	2033	GGGTCTTGCCACTGATGTCC	50	499
367322	Codificación	462	2043	GACTGGATCTGGGTCTTGCC	67	500
367323	Codificación	462	2273	CACAGATGAACTTGGTCTTC	32	501
367324	Codificación	462	2283	GTTGGTGTACACAGATGAA	35	502
367325	Codificación	462	2303	CAATGGTATTGCTGCAGGTC	50	503
367326	Codificación	462	2308	CAGGTCAATGGTATTGCTGC	64	504
367327	Codificación	462	2341	CATCAATGAATCTAAAGTGC	72	505
367328	Codificación	462	2346	AACTGCATCAATGAATCTAA	50	506
367329	Codificación	462	2351	TTCCAACTGCATCAATGAA	40	507
367330	Codificación	462	2356	GTTATTTCCAACTGCATCA	46	508
367331	Codificación	462	2423	AGGTCAGATCCATGTCAAAC	61	509
367332	3' UTR	462	2893	AGTCCTAGCTTCTATGTGGA	70	510
367333	3' UTR	462	2307	ATCAATGAATGGTGTACAC	0	511

Ejemplo 34

Inhibición antisentido de STAT3 lleva a muerte celular e inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de mieloma múltiple

En una realización adicional, fue investigado el requerimiento para STAT3 en el desarrollo de mieloma múltiple y en el crecimiento de tumores derivados de mieloma múltiple. Ratones transgénicos NPM-ALK (NPM-ALK Tg) desarrollaron espontáneamente mieloma múltiple caracterizado por STAT3 activado constitutivamente. Para determinar si la STAT3 es requerida para el desarrollo de mieloma múltiple, la STAT3 fue perturbada genéticamente en células B de ratones NPM-ALK Tg. El locus de STAT3 de ratón fue manipulado para contener sitios de reconocimiento de Cre recombinasa (sitios loxP) como fue descrito previamente (Raz et al., PNAS, 1999, 96, 2846-2851). Cuando los ratones que portaban este locus de STAT3 modificado fueron cruzado con ratones que alojaba un transgen de Cre combinasa, la Cre combinasa corta la porción del locus flanqueada por los sitios loxP, dando como resultado un locus STAT3 borrado. Los ratones NPM-ALK Tg fueron cruzados para introducir el gen STAT3 perturbado condicionalmente. Estos ratones fueron cruzados entonces con ratones que portaban un transgen Cre específico de CD 19+, el cual expresa Cre bajo el control del gen CD19 restringido del linaje B (Rickert et al., Nuc. Acids Res., 1997, 25, 1317). Las crías resultantes alojaban una eliminación específica en células B del gen STAT3. Las células B pueden ser identificadas por el antígeno CD19, y maduran en las células de plasma responsables del mieloma múltiple, las cuales son identificadas por la presencia de los antígenos tanto CD19 como CD 138.

Los ratones fueron cruzado como se describió y la genotipia de las crías reveló que más del 80% de todas las células CD19+ o CD138+ (identificadas como se describió previamente, Chiarle et al., Blood, 2003, 101, 1919-1927) sufrieron eliminación de STAT3. Además, en 23 animales NPM-ALK Tg deficientes en STAT3 examinados, no se detectaron células de mieloma múltiple negativas a STAT3. Se prepararon extractos nucleares a partir de estas células como se describió previamente (Mora et al., Cancer Res. 62:6659, 2002). La detección de STAT3 fosforilado en extracto nucleares por transferencia Western como se describe aquí reveló que todas las células de mieloma múltiple CD138+ en estos ratones contenían STAT3 fosforilado nuclear detectable. Según se determinó por transferencia Southern (como se describe en Raz et al., PNAS, 1999, 96, 2846-2851), el gen STAT3 en estas células estaba intacto. Estos datos demuestran que el STAT3 es absolutamente requerido para la transformación de las células de plasma.

Las células CD19+ positivas para STAT3 dieron como resultado el desarrollo de mieloma múltiple, y las células con mieloma múltiple fueron trasplantadas en ratones receptores. Los efectos de la inhibición antisentido de STAT3 fueron probados en los tumores resultantes. Las células de mieloma múltiple fueron inyectadas por vía subcutánea (2×10^6 células) o intravenosa (1×10^7 células) en ratones lampiños o singénicos (ratones Balb/c). Los animales con tumores de mieloma múltiple medibles (aproximadamente 0.5 mm^3) fueron inyectados diariamente con ISIS 17152 (SEQ ID NO: 99) o el oligonucleótido de control ISIS 28084 (SEQ ID NO: 151) a una dosis de 20 mg/kg durante 14 días. Las inyecciones fueron administradas por vía subcutánea, contralateralmente a los tumores. Cada grupo de tratamiento incluyó de 3 a 9 animales.

Después de 15 días de tratamiento con oligonucleótido, el crecimiento tumoral en animales inyectados con ISIS 17152 fue reducido a 15% con respecto al de los animales inyectados con oligonucleótido de control. Según se juzga por el análisis histológico de rutina, los tumores tratados con ISIS 17152 desplegaron áreas necróticas grandes a lo largo de los mismos, en comparación con los tumores tratados con el oligonucleótido de control, el cual muestra solamente cifras apoptóticas sencillas. Adicionalmente, los niveles de IgM en suero, los cuales se incrementan en mieloma múltiple, fueron medidos por ELISA usando un kit disponible comercialmente (por ejemplo, OPT-EIA™, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) y se encontró que disminuyeron en animales tratados con ISIS 17152, en comparación con los animales tratados con el oligonucleótido de control. Adicionalmente, la rata global de supervivencia de los animales que recibieron el tratamiento con ISIS 17152 se incrementó significativamente, con respecto a los animales de control.

Se llevó a cabo un experimento similar en ratones en los cuales se habían desarrollado tumores de 1 cm^3 , para probar los efectos de la inhibición antisentido de STAT3 sobre tumores bien establecidos. Los ratones fueron tratados diariamente durante 14 días con 40 mg/kg de ISIS 17152 o del oligonucleótido de control. En este experimento, se observó necrosis tumoral y detención del ciclo de células tumorales como resultado de la inhibición antisentido de STAT3.

La apoptosis en tumores fue evaluada por la tinción con Annexin-V, utilizando un kit de tinción Annexin-V (Clontech, Palo Alto, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células fueron resuspendidas en 0.2 mL de regulador de tinción (HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 140 mM, CaCl_2 5 mM) y 10 μL de yoduro de propidio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 5 μL de reactivo Annexin-V que fueron agregados a 4°C durante 10 minutos. Las muestras fueron diluidas con el regulador FACSFlow y analizadas sobre un Becton Dickinson FACScan™ (Mountain View, CA). En células tumorales de ratones que recibieron el oligonucleótido antisentido direccionado a STAT3, se observó un incremento de aproximadamente 2 veces en las células tumorales positivas a Annexin-V, en comparación con el control. La apoptosis también fue evaluada por tinción TUNEL, llevada a cabo usando un kit comercialmente disponible (por ejemplo, APO-DIRECT™, Pharmingen, BD Biosciences, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En células tumorales de ratones tratados con ISIS 17152, estuvieron presentes grandes áreas de células

positivas a TUNEL, en contraste con los tumores tratados con el oligonucleótido de control. Estos datos demuestran que la inhibición antisentido produjo apoptosis en tumores de mieloma múltiple trasplantados.

La detención del ciclo celular fue evaluada por citometría de flujo. Se prepararon células como se describe aquí. Las células de tumores tratados con ISIS 17152 (dosis de 20 mg/kg) exhibieron una reducción del 45% en la población en fase S, en comparación con células de tumores tratados con control. Así, la inhibición antisentido de STAT3 lleva a una detención en la fase G1 del ciclo celular.

Los tumores de mieloma múltiple primarios y tumores trasplantados fueron evaluado por transferencia Western para la expresión de STAT3, STAT3 fosforilada, Bcl-xL, survivina, ERK, ERK fosforilada y c-myc. Los lisados de proteína fueron preparados y sometidos a análisis por transferencia Western, utilizando anticuerpos disponibles comercialmente (anticuerpos de STAT3 y STAT3 fosforilada obtenidos como se describió aquí; otros anticuerpos están disponibles en Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Tanto en tumores de mieloma múltiple primarios como trasplantados, se observaron altos niveles de estas proteínas, indicando que las células del tumor trasplantadas exhiben características similares a las células tumorales primarias.

También se probaron tratamientos de combinación en el modelo de ratón de mieloma múltiple. Animales que portaban tumores originados de células de mieloma múltiple trasplantadas fueron tratados con ISIS 17152 en combinación con bortezomib (conocido comercialmente como Velcade®, Millenium Pharmaceuticals, Cambridge, MA) o ciclofosfamida (conocida comercialmente como Endoxana®, AstaMedica, Frankfurt, Alemania). Un grupo de tratamiento, consistente de al menos 10 animales, recibe una dosis subcutánea diaria de ISIS 17152 a 20 mg/kg, en combinación con bortezomib, durante 14 días. El bortezomib es administrado por vía intravenosa a dosis que varían desde 0.05 mg/kg a 1.0 mg/kg, dos veces a la semana para el periodo de estudio de 14 días. Un grupo de tratamiento adicional, consistente de al menos 10 animales, recibe una dosis diaria subcutánea de ISIS 17152 a 20 mg/kg, en combinación con ciclofosfamida. La ciclofosfamida se administra intraperitonealmente a una dosis de 35 mg/kg, dos veces a la semana durante el periodo de estudio de 14 días. En los grupos de tratamiento de combinación, se evalúan los siguientes puntos finales: crecimiento tumoral, rata de supervivencia, niveles de IgM en suero, apoptosis, detención del ciclo celular, niveles de proteína de STAT3 y STAT3 fosforilada, y necrosis tumoral.

Estos datos demuestran que la inhibición antisentido de STAT3 lleva a una detención de la fase G1, muerte celular e inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*. Así, los oligonucleótidos antisentido direccionados a STAT3 son agentes terapéuticos con aplicaciones en el tratamiento de mieloma múltiple.

Listado de secuencias

<110> Isis Pharmaceuticals, Inc.

<120> modulación de oligonucleótidos antisentido de la expresión STAT3

<130> ISPH-0883

5 <140>

 <141>

 <150> 10/773,678

 <151> 2004-02-06

 <150> 10/713,139

10 <151> 2003-11-14

 <150> 09/758,881

 <151> 2001-01-11

 <150> PCT/US00/09054

 <151> 2000-04-06

15 <150> 09/288,461

 <151> 1999-04-08

 <160> 511

 <170> PatentIn Ver. 2.1 y FastSeq Ver. 4.0

 <210> 1

20 <211> 2787

 <212> ADN

 <213> Homo sapiens

 <400> 1

cagctggaat	tccggggcggc	ggcgagagact	gggaggggga	gccggggggt	ccgacgtcgc	60
agccgagggga	acaagcccca	accggatcct	ggacaggcac	cccggcttgg	cgctgtctct	120
ccccctcggc	tccgagagggc	ccttcggcct	gagggagcct	cgccgcccgt	ccccggcaca	180
cgcgagagccc	cgccctctcg	gcctctgccg	gagaaacagg	atggcccaat	ggaatcagct	240
acagcagctt	gacacacggt	acctggagca	gctccatcag	ctctacagt	acagcttccc	300
aatggagctg	cggcagtttc	tggcccttg	gattgagagt	caagattggg	catatcgggc	360
cagcaaaaga	tcacatgcca	ctttggtgtt	tcataatctc	ctgggagaga	ttgaccagca	420
gtatagccgc	ttcctgcaag	agtccaatgt	tctctatcag	caaatctac	gaagaatcaa	480
gcagtttctt	cagagcaggt	atcttgagaa	gccaatggag	attgcccgga	ttgtggcccg	540
gtgcctgtgg	gaagaatcac	gccttctaca	gactgcagcc	actcgggcc	agcaaggggg	600
ccaggccaac	cacccacag	cagccgtggt	gacggagaag	cagcagatgc	tggagcagca	660
ccttcaggat	gtccggaaga	gagtgcagga	tctagaacag	aaaatgaaag	tggtagagaa	720
tctccaggat	gactttgatt	tcaactataa	aaccctcaag	agtcaaggag	acatgcaaga	780
tctgaatgga	aacaaccagt	cagtgcagc	gcagaagtgc	cagcagctgg	aacagatgct	840
cactcgctg	gaccagatgc	ggagaagcat	cgtagtgag	ctggcggggc	ttttgtcagc	900
gatggagtac	gtgcagaaaa	ctctcacgga	cgaggagctg	gctgactgga	agaggcggca	960
acagattgcc	tgcattggag	gcccgcctaa	catctgccta	gatcggttag	aaaactggat	1020
aacgtcatta	gcagaatctc	aacttcagac	ccgtcaacaa	attaagaaac	tggaggaggt	1080
gcacaaaaaa	gtttcctaca	aaggggaccc	cattgtacag	caccggccga	tgctggagga	1140
gaggatcgtg	gagctgttca	gaaacttaac	gaaaagtgc	tttgtggtgg	agcggcagcc	1200
ctgcatgccc	atgcacccctg	accggccct	cgatcatcaag	accggcgtcc	agttcactac	1260
taaagttagg	ttgctggtca	agttccctga	gttgaattat	cagcttaaaa	ttaaagtgtg	1320
cattgacaaa	gactctgggg	acgttgacgc	tctcagagga	tcccggaat	ttaacattct	1380
gggcacaaaac	acaaaagtga	tgaacatgga	agaatccaac	aacggcagcc	tctctgcaga	1440
attcaaacac	ttgaccctga	gggagcagag	atgtgggaat	gggggccgag	ccaattgtga	1500
tgcttccctg	attgtgactg	aggagctgca	cctgatcacc	tttgagaccg	aggtgtatca	1560
ccaaggtctc	aagattgacc	tagagaccga	ctccttgtca	gttgtggtga	tctccaacat	1620
ctgtcagatg	ccaaatgcct	gggcgtccat	cctgtggtac	aacatgctga	ccaacaatcc	1680
caagaatgtg	aacttcttca	ctaagccgcc	aattggaacc	tgggaccaag	tggccgaggt	1740

gctcagctgg	cagttctcgt	ccaccaccaa	gcgggggctg	agcatcgagc	agctgacaac	1800
gctggctgag	aagtccttag	ggcctggtgt	gaactactca	gggtgtcaga	tcacatgggc	1860
taacttctgc	aaagaaaaca	tggctggcaa	gggcttctcc	tactgggtct	ggctagacaa	1920
tatcatcgac	cttgtgaaaa	agtatatctt	ggcccttttg	aatgaagggt	acatcatggg	1980
tttcatcagc	aaggagcggg	agcgggcat	cttgagcact	aagccccag	gcaccttctt	2040
gctgcgcttc	agtgaagca	gcaaagaagg	aggcgtcact	ttcacttggg	tggagaagga	2100
catcagcggg	aagaccaga	tccagtccgt	ggaaccatac	acaaagcagc	agctgaacaa	2160
catgtcattt	gctgaaatca	tcatgggcta	taagatcatg	gatgctacca	atatcctgtt	2220
gtctccactt	gtctatctct	atcctgacat	tcccaaggag	gaggcattcg	ggaagtattg	2280
tccggccagag	agccaggagc	atcctgaagc	tgaccaggt	agcgtgccc	catacctgaa	2340
gaccaagtgt	atctgtgtga	caccaacgac	ctgcagcaat	accattgacc	tgccgatgtc	2400
cccccgcgct	ttagattcat	tgatgcagtt	tggaaataat	ggtgaagggt	ctgaaccctc	2460
agcaggaggg	cagtttgagt	ccctcacctt	tgacatggag	ttgacctcgg	agtgcgtac	2520
ctcccccatg	tgaggagctg	agaacggaag	ctgcagaaag	atacgactga	ggcgctacc	2580
tgcatctctg	caccctcac	acagccaaac	cccagatcat	ctgaaactac	taactttgtg	2640
gttcagagatt	ttttttaatc	tcctacttct	gctatctttg	agcaatctgg	gcacttttaa	2700
aaatagagaa	atgagtgaat	gtgggtgatc	tgtttttatc	taaatgcaaa	taaggatgtg	2760
ttctctgaga	cccatgatca	ggggatg				2787

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 2

gtctgcgccg ccgccccgaa 20

<210> 3

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 3

ggccgaaggg cctctccgag 20

15 <210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 4

tcctgtttct ccggcagagg 20

25

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 5

35

<210> 6

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 6

gccatcctgt ttctccgca 20

10

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 7

20 gggccatcct gtttctccg 20

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

30 <400> 8

ttgggccatc ctgtttctcc 20

<210> 9

<211> 20

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 9

cattgggcca tcctgttct 20

<210> 10

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15

<400> 10

tccattgggc catcctgtt 20

<210> 11

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 11

attccattgg gccatcctgt 20

30 <210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 12

tgattccatt gggccatcct 20

<210> 13

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 13

gctgattcca ttgggccatc 20

15 <210> 14

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 14

tagctgattc cattgggcca 20

25

<210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 15

35 tgtagctgat tccattgggc 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 16
 ctgtagagct gatggagctg 20
 10
 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 17
 20 cccaatcttg acttcaatc 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 18
 30 cccaggagat tatgaaacac 20

 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 19

5 acattcgact ctgcaggaa 20

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 20

15 tctgaagaaa ctgcttgatt 20

<210> 21

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 21

ggccacaatc cgggcaatct 20

<210> 22

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35

<400> 22

tggctgcagt ctgtagaagg 20

 <210> 23
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 10

 <400> 23
 ctgctccagc atctgctgct 20

 <210> 24
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20

 <400> 24
 tttctgttct agatcctgca 20

 <210> 25
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 25
 tagttgaaat caaagtcac 20

 35 <210> 26
 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 26

ttccattcag atcttgcag 20

10 <210> 27

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 27

tctgttccag ctgctgcac 20

20

<210> 28

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 28

30 tcactcacga tgcttctccg 20

<210> 29

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 29

5 gagtttctg cacgtactcc 20

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 30

atctgttgcc gcctctcca 20

<210> 31

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 31

ctagccgatc taggcagatg 20

<210> 32

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 32

cgggtctgaa gttgagattc 20

<210> 33

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 33

cggccggtgc tgtacaatgg 20

15 <210> 34

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 34

tttcattaag ttctgaaca 20

25

<210> 35

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 35

35 aggatgcatg ggcattgcagg 20

<210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 36
 10 gaccagcaac ctgacttag 20

 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 37
 atgcacactt taattttaag 20

 <210> 38
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 30
 <400> 38
 ttccgggatc ctctgagagc 20

 <210> 39
 35 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5

<400> 39

ttccatgttc atcactttg 20

<210> 40

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 40

gtcaagtgtt tgaattctgc 20

20 <210> 41

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 41

caatcaggga agcatcacao 20

30 <210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 42
 tacacctcgg tctcaaaggt 20

5 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 43
 tgacaaggag tgggtctcta 20

15 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 44
 25 cgcccaggca ttggcatct 20

<210> 45
 <211> 20
 <212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 45
 cattctggg attgttggtc 20

<210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 46
 10 cacttggtcc caggttcaa 20

 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 47
 cccgcttggt ggtggacgag 20

 <210> 48
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 30 <400> 48
 agttcacacc aggccctagg 20

 <210> 49
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 49

gtttcttg cagaagtag 20

<210> 50

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 50

atattgtcta gccagacca 20

<210> 51

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 51

25 aacctatgat gtaccctca 20

<210> 52

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 52

gcttagtgct caagatggcc 20

<210> 53

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

10 <400> 53

gctgcttca ctgaagcgca 20

<210> 54

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

20 <400> 54

gtgaaagtga cgctccttc 20

<210> 55

<211> 20

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

30

<400> 55

ctgatgtcct tctccacca 20

<210> 56

35 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5

<400> 56

actggatctg ggtcttaccg 20

<210> 57

10

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 57

aaatgacatg ttgttcagct 20

<210> 58

20

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 58

gcccatgatg atttcagcaa 20

30

<210> 59

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 59
tattggtagc atccatgatc 20

5 <210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 60
atagacaagt ggagacaaca 20

15 <210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 61
ttgggaatgt caggatagag 20

25 <210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 62
ctcctggctc tctggccgac 20

35 <210> 63

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 63
 acctgggtca gcttcaggat 20

10 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 64
 20 cacagataaa ctggtcttc 20

<210> 65
 <211> 20
 <212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

30 <400> 65
 atcggcaggat caatgttatt 20

<210> 66
 <211> 20
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 66

5 ccaaactgca tcaatgaatc 20

<210> 67

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 67

ggttcagcac cttcaccatt 20

<210> 68

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 68

gagggactca aactgccctc 20

<210> 69

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 69
 caactccatg tcaaaggtga 20
 <210> 70
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 10
 <400> 70
 ttctcagctc ctcacatggg 20

 <210> 71
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 71
 cgttctcagc tcctcacatg 20

 25 <210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 72
 tccggttctca gctcctcaca 20
 35
 <210> 73

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 73
 ctccgttct cagctctca 20

10 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 74
 agcttccgtt ctcagctcct 20

20 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 75
 30 agaatgcagg taggcgcctc 20

 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 76

accacaaagt tagtagttc 20

5

<210> 77

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 77

15 tgctcaaaga tagcagaagt 20

<210> 78

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 78

25 attcactcat ttctctatt 20

<210> 79

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 79

catttagata aaagcagatc 20

<210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 80
 acatccttat ttgcatttag 20

 <210> 81
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 81
 gatcatgggt ctcagagaac 20
 <210> 82
 <211> 2869
 25 <212> ADN
 <213> Mus musculus

 <400> 82

gccgcgacca	gccaggccgg	ccagtcgggc	tcagcccggga	gacagtcgag	acccctgact	60
gcagcaggat	ggctcagtgg	aaccagctgc	agcagctgga	cacacgctac	ctgaagcagc	120
tgcaccagct	gtacagcgac	acgttcccca	tggagctgcg	gcagttcctg	gcaccttgga	180
ttgagagtca	agactgggca	tatgcagcca	gcaaagagtc	acatgccacg	ttggtgtttc	240
ataatctctt	gggtgaaatt	gaccagcaat	atagccgatt	cctgcaagag	tccaatgtcc	300
tctatcagca	caaccttcga	agaatcaagc	agtttctgca	gagcaggtat	cttgagaagc	360
caatggaaat	tgcccggatc	gtggccccgat	gcctgtggga	agagtctcgc	ctcctccaga	420
cggcagccac	ggcagcccag	caaggggggcc	aggccaacca	cccaacagcc	gccgtagtga	480
cagagaagca	gcagatgttg	gagcagcatc	ttcaggatgt	ccggaagcga	gtgcaggatc	540
tagaacagaa	aatgaagggtg	gtggagaacc	tccaggacga	ctttgatattc	aactacaaaa	600
ccctcaagag	ccaaggagac	atgcaggatc	tgaatggaaa	caaccagtct	gtgaccagac	660
agaagatgca	gcagctggaa	cagatgctca	cagccctgga	ccagatgctg	agaagcattg	720
tgagtgaagt	ggcggggctc	ttgtcagcaa	tggagtacgt	gcagaagaca	ctgactgatg	780
aagagctggc	tgactggaag	aggcggcagc	agatcgctg	catcggaggc	cctcccaaca	840
tctgcctgga	ccgtctggaa	aactggataa	cttcatttagc	agaatctcaa	cttcagaccc	900
gccaacaaat	taagaaactg	gaggagctgc	agcagaaagt	gtcctacaag	ggcgacccta	960
tcgtgcagca	ccggcccatg	ctggaggaga	ggatcgtgga	gctgttcaga	aacttaatga	1020
agagtgcctt	cgtggtggag	cggcagccct	gcatgcccat	gcaccgggac	cggcccttag	1080
tcatcaagac	tgggtgtccag	tttaccacga	aagtacaggtt	gctggtcaaa	tttctctgagt	1140
tgaattatca	gcttaaaaatt	aaagtgtgca	ttgataaaga	ctctggggat	gttgctgccc	1200
tcagagggtc	tcggaaattt	aacattctgg	gcacgaacac	aaaagtgatg	aacatggagg	1260
agtctaacaa	cggcagcctg	tctgcagagt	tcaagcacct	gacccttagg	gagcagagat	1320
gtgggaatgg	aggcctgccc	aattgtgatg	cctccttgat	cgtgactgag	gagctgcacc	1380
tgatcacctt	cgagactgag	gtgtaccacc	aaggcctcaa	gattgacct	gagaccact	1440
ccttgccagt	tgtggtgatc	tccaacatct	gtcagatgcc	aaatgcttgg	gcatcaatcc	1500
tgtggtataa	catgctgacc	aataacccca	agaacgtgaa	cttcttccact	aagccgccaa	1560
ttggaacctg	ggaccaagtg	gccgaggtgc	tcagctggca	gttctcgtcc	accaccaagc	1620
gagggctgag	catcgagcag	ctgacaacgc	tggctgagaa	gctcctaggg	cctggtgtga	1680
actactcagg	gtgtcagatc	acatgggcta	aattctgcaa	agaaaacatg	gctggcaagg	1740
gcttctcctt	ctgggtctgg	ctagacaata	tcatcgacct	tgtgaaaaag	tatatcttgg	1800
ccctttggaa	tgaagggtac	atcatgggtt	tcatcagcaa	ggagcgggag	cgggccatcc	1860
taagcacaaa	gccccggggc	accttcctac	tgcgcttcag	cgagagcagc	aaagaaggag	1920
gggtcacttt	cacttggttg	gaaaaggaca	tcagtggcaa	gaccagatc	cagtctgtag	1980
agccatacac	caagcagcag	ctgaacaaca	tgctcatttg	tgaaatcatc	atgggctata	2040
agatcatgga	tgcgaccaac	atcctggtgt	ctccacttgt	ctacctctac	cccgacattc	2100
ccaaggagga	ggcatttgga	aagtactgta	ggcccagagag	ccaggagcac	cccgaagccg	2160
accaggttag	tgtgccccg	tacctgaaga	ccaagttcat	ctgtgtgaca	ccaacgacct	2220
gcagcaatac	cattgacctg	ccgatgtccc	cccgactttt	agattcattg	atgcagtttg	2280
gaaataacgg	tgaagggtgct	gagccctcag	caggagggca	gtttgagtcg	ctcacgtttg	2340
acatggatct	gacctcggag	tgtgctacct	cccccatgtg	aggagctgaa	accagaagct	2400
gcagagacgt	gacttgagac	acctgccccg	tgtccacccc	ctaagcagcc	gaaccccata	2460
tcgtctgaaa	ctcctaactt	tgtggttcca	gatttttttt	tttaatttcc	tacttctgct	2520
atctttgggc	aatctgggca	cttttttaaaa	gagagaaatg	agtgagtgtg	ggtgataaac	2580
tgttatgtaa	agaggagaga	cctctgagtc	tggggatggg	gctgagagca	gaaggagggc	2640
aaaggggaac	acctcctgtc	ctgcccgcct	gccctccttt	ttcagcagct	cgggggttgg	2700
ttgttagaca	agtgcctcct	ggtgcccctg	gctacctgtt	gcccactct	gtgagctgat	2760
acccatttct	gggaactcct	ggctctgcac	tttcaacctt	gctaatatcc	acatagaagc	2820
taggactaag	cccaggaggt	tcctctttta	attaaaaaaa	aaaaaaaaa		2869

<210> 83

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 83

5 gttccactga gccatcctgc 20

<210> 84

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 84

ttcaggtagc gtgtgtccag 20

<210> 85

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 85

atgtgactct ttgctggctg 20

<210> 86

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 86
 ccaagagatt atgaaacacc 20

 <210> 87
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 10
 <400> 87
 gctccaacat ctgctgcttc 20

 <210> 88
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 88
 gctcttcac agtcagtgctc 20

 25 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 89
 atctgacacc ctgagtagtt 20
 35
 <210> 90

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 90

gccagaccca gaaggagaag 20

10

<210> 91

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 91

cgctcctgc tgatgaaacc 20

20

<210> 92

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 92

aacttggtct tcaggtacgg 20

30

<210> 93

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 93

atcaatgaat ctaaagtgcg 20

5

<210> 94

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 94

15 tcagcacctt caccgttatt 20

<210> 95

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 95

25 actcaaactg ccctcctgct 20

<210> 96

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 96

ggttcagct cctcacatgg 20

<210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 97
 taataaaaaaa aatctggaac 20

 <210> 98
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 98
 aagatagcag aagtaggaaa 20

 <210> 99
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 30
 <400> 99
 aaaaagtgcc cagattgccc 20

 <210> 100
 35 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5

<400> 100

atcacccaca ctactcatt 20

<210> 101

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 101

cctttgcctc cctctgctc 20

<210> 102

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 102

tgaaaaagga gggcaggcgg 20

<210> 103

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 103
caccaggagg cacttgctca 20

<210> 104
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 104
aacctcctgg gcttagtcct 20

15 <210> 105
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 105
aaaaagtgcg cagattgccc 20

25 <210> 106
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 106
35 aaaaagtccg ctgattgccc 20

<210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 107
 aaaaactccg ctgaatgccc 20
 10
 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 108
 20 atgtgattct ttgctggccg 20

 <210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 30 <400> 109
 agctgattcc attgggcat 20

 <210> 110
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 110

ccaggagatt atgaaacacc 20

<210> 111

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 111

accgtgtgtc aagctgctgt 20

<210> 112

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 112

ccattgggaa gctgtcactg 20

<210> 113

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 113
tgtgattctt tgctggccgc 20

<210> 114
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 114
gcggctatac tgctggtaa 20

15 <210> 115
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 115
gctccagcat ctgctgcttc 20

25 <210> 116
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 116
gattcttccc acaggcaccg 20
35
<210> 117

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 117
 tgattctcc cacaggcacc 20

 10 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 118
 atcctgaagg tgctgctcca 20
 20
 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 119
 cggacatcct gaaggtgctg 20
 30
 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 120

cccgccagct cactcacgat 20

5

<210> 121

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 121

15 agtcagccag ctctcgtcc 20

<210> 122

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 122

ccagtcagcc agctcctcgt 20

<210> 123

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 123

35 cgcctcttcc agtcagccag 20

	<210> 124	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5		
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 124	
10	ggccggtgct gtacaatggg	20
	<210> 125	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
20	<400> 125	
	atcctctcct ccagcatcgg	20
	<210> 126	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
30		
	<400> 126	
	ccgctccacc acaaaggcac	20
	<210> 127	
35	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
5	<400> 127	
	cgtccccaga gtctttgtca	20
	<210> 128	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
15	<400> 128	
	ttgtgtttgt gcccagaatg	20
	<210> 129	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 129	
	gctcggcccc cattccaca	20
30	<210> 130	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	

	<400> 130	
	aggcatttgg catctgacag	20
5	<210> 131	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 131	
	cttgggattg ttgtcagca	20
15	<210> 132	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 132	
	ctcggccact tgggtccagg	20
25	<210> 133	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 133	
	ccccgcttgg tgggtggacga	20
35	<210> 134	

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 134

cccccgcttg gtgtggacg 20

10

<210> 135

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 135

ggagaagccc ttgccagcca 20

20

<210> 136

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 136

30 ttcatccaa agggccaaga 20

<210> 137

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 137

5 cccgctcctt gctgatgaaa 20

<210> 138

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 138

gtgctcaaga tggcccgcctc 20

<210> 139

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 139

cccaagtgaag agtgacgcct 20

<210> 140

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35

<400> 140

	acccaagtga aagtgacgcc	20
	<210> 141	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
10		
	<400> 141	
	ccgaatgcct ctccttggg	20
	<210> 142	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 142	
	gccgacaata cttcccgaat	20
25	<210> 143	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 143	
	gatgctcctg gctctctggc	20
35	<210> 144	
	<211> 20	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
5		
	<400> 144	
	tcaatgaatc taaagcgcg	20
	<210> 145	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
15		
	<400> 145	
	gactcaaact gccctcctgc	20
	<210> 146	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 146	
	atcacccaca ttactcatt	20
	<210> 147	
30	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido Antisentido	

<400> 147
aaaagtgtccc agattgc 17

<210> 148
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 148
aaaagtgtccc agattgtca 20

15 <210> 149
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 149
taaaagtgtcc cagattgtc 20

25 <210> 150
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 150
35 aagcagatca cccacattca 20

<210> 151
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 151
 aaaaagaggc ctgattgcc 20

 10 <210> 152
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 152
 tctggcaaag tgtcagtatg 20
 20
 <210> 153
 <211> 74424
 <212> ADN
 <213> H. sapiens
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 153

agagcgggca	ggagggagct	gtatcagggg	cattttaaagt	gccttgacgt	cacgcactgc	60
caggaactca	gctgagtttt	cagcaggaca	ttccgggtcat	cttccctccc	ttccccggg	120
cttctgtgcc	caagtccctcg	gctcttccct	cgctgtggcg	gagggaggag	caccgaactg	180
tcggaacagc	cagcacaggg	gcgtatcagt	ctcctcttgg	ctccgccctt	tctcctagct	240
gctctcctca	ttggtcagtg	ggcggggctt	cggtgtacc	gcacacgcac	tgggacctct	300
gggtggccga	acgagctggc	ctttcatgaa	ttatgcatga	cggcgtgcct	cggccaggct	360
ggggctgggc	gaggattggc	tgaaggggct	gtaattcagc	ggtttccgga	gctgcggcgg	420
cgcagactgg	gagggggagc	cgggggttcc	gacgtcgag	ccgagggaac	aagccccaac	480
cggatcctgg	acaggcaccc	cggcttggcg	ctgtctctcc	ccctcggctc	ggagaggccc	540
ttcggcctga	gggagcctcg	ccgccctcc	ccggcacacg	cgcagccccg	gcctctcggc	600
ctctgccgga	gaaacagggtg	aaggggggtgc	agggtggggc	cgttggggag	gcctggggac	660
ccgggggctc	cgcagcggca	gggggcctct	gggaccttgg	ggatgttgtg	atggacgctg	720
cagtggggcc	gggagagatg	aagagacgcg	gagggtcgcc	ctgaggggaag	actcttcggg	780
atgacaggag	cgggcctcg	aagggactcg	gggcgctgga	gggaagtttc	gttcttcgga	840
gaaacagaac	cggtcagag	gggcacccgtg	gggcgagggc	gcactcgggt	gcggcggcag	900
gagtggggga	cagtcccccg	atttctctgt	ccctggggcc	ctggggacgt	tccggccacc	960
ggagcgactg	tcacgccgac	ggggatcacc	ggcgcgagtg	gggggtcgga	aagcgcctcc	1020
tccccgccc	gtcggcggct	cccgtgagc	cacttccctcc	gcttgccctg	ttcccgtctc	1080
ttcaggagac	agctgtgccc	ttttggaggc	aggaataggt	gtgtctgtcg	cctgcagcct	1140
tacgggctgg	ctggctcgtgg	gtaggcttta	gtcataaga	atcaagtttc	ctgtagggaa	1200
attgacagac	cgttactctt	tctaatttcc	ctcgcactctt	tttctagggt	aaattatgct	1260
ccccccacgt	ccccgccttg	taaaaaagag	aaaaaaagac	aaaataaaat	ccccatcaac	1320
ccgtcaagcc	agctctagag	agagaaataa	acctcttgac	attgtccttt	tccaaatacc	1380
tggtaaagt	ggccagaaga	taaataattg	agccattgca	tttactggat	tgtggtgttg	1440
cttaattgca	taggacggaa	tgaaccaatt	gagagtggga	gttttctgtc	tcagagccaa	1500
gatcttgggt	gagagcgag	gagagggaaa	caaagacagg	ctggccttga	aaaaaccatg	1560
tgtgcaaac	ttacatgcac	ttgggggggtg	tggttgact	gaagttaaca	agattcaaac	1620
cgtcgcccaa	gttggtat	ccatgtttgg	tacacatcac	tctgtgccat	atcaggtcgt	1680
tgttaagtgt	ggtgacaaaa	tcagtgggta	gtcatttttt	taattaaaaa	tgtgtatagt	1740
gtgtacctgc	tggtcttact	gtatgtgcaa	ctaaagggtt	acatagtctg	tgtatgggtt	1800
gtaaat	ggctggctgt	gctgataaag	cattgggctt	gaataaagca	aagcagaaaa	1860
tcactcaat	cttttatatg	tggatttaga	ctgtgttatg	acttggttca	gccagttttc	1920
tatcttattt	tattttaaat	atgtctgtgt	tctctgagtc	agcacattta	tttcttatt	1980
acatgttcca	gacaggagtg	ctagcccagt	ttttgttcag	tttgcacagt	gggatgggga	2040
aacaagtctg	gaatttaaaa	aaaaatgttt	tagaggttgg	agccttgatt	ttagtctcta	2100
tattagcaca	tccatcacaa	agaaccatta	gtaaattcat	gaatcttttg	ttttttatgt	2160
agttcat	agaagaataa	tcacttagaa	atatccacag	tgccaggcat	ggtggtgcac	2220
acctctgatc	ccagctaatt	gaaggctgag	gtgggaggat	tccttgagtc	caggagtga	2280
gtctggtctg	ggcaacatgg	tgagaggcca	ggaattgggt	ctagagtccta	gtctaagcac	2340
cataatgaga	acccatcttt	aagaaagaaa	gaaaggaaa	gaggaagaaa	ggaaagaaa	2400
agaaataccc	acagcacagt	tatgaattaa	cccacaaagg	acttgtgagg	tgggtagttc	2460
acataacaat	taccctaata	tcgtagataa	gaaaattgag	gccaaaggat	caagacactt	2520
ggccaacgca	gcagagtgcc	atagtgggtg	aatttgtgcc	tccttctgta	tattttgtga	2580
aaagtatcag	tgaattctt	tttttttttt	tttttgagtc	agagtcttgc	tctgttggcc	2640
aggctagagt	gcagtgggc	aatcttggct	cactgcaacc	tctgcctcct	gggttcaagg	2700
gattctcctg	cctcagcctc	ccaagtagct	gggactacag	gcgtgcgcca	ccacgcccag	2760
ctaatttttg	tatttttagt	agagaccggg	gttttaccat	attggccagg	ctggctctga	2820
actcctgacc	ttgtgatttg	cccacctcta	tctcccaaag	tgctgggatt	acaggtgtga	2880
gccaccgcgc	ccaagtaagta	tcagtgaat	tctaacatat	atctgaacag	taaaatacca	2940
ccaataggct	gaaagacttc	atgggaggtg	aatattcaat	aaacagggtg	aaaaagaaat	3000
acaaatggag	cttgcttaga	ttatttttct	tctaacttgg	tctaacttgg	gaagtggagg	3060
actgtttttg	gtcagcataa	tttaccatca	gaatttagct	atttactaat	gaaaagaaat	3120
actaatctag	gtttgtttta	gattaaggac	agtcattgac	taaatgtcat	ttaaaccaga	3180
gtgcattgtg	gcttgatcag	tggtcatttc	tgtctctaga	aagttgcttt	aacttctctg	3240
cctctacgtg	tctcttgaca	ttcagatatg	agggtggggtg	gaggtgggtg	ccaactttcc	3300
agacgcctga	gtccaaacct	tcttagctta	tggttttctt	agggtgatgtg	caaatcaaca	3360
aatatatact	tttttttttt	tttttttgag	ttggagttgc	actctatcac	ccaggctgga	3420
gtgcagtggc	atgatcgtgg	ctcactgcaa	cctcctcctc	ccgggttcaa	gtgattctcg	3480
cacctcagcc	tcctgagtag	ctgggattac	agggtgccgc	cactacgccc	ggctaatttt	3540
tgtattttta	gtagagataa	ggtttacta	tattgaccag	gctggctctca	aactcctgac	3600
ctcaagagat	ctgccacct	cagcctccca	aagtgtctgg	attacaggcg	tgaaccacct	3660
tgcttgccca	acatatatat	accttttgca	actttgtcag	agttgtctatg	agaataaagt	3720
tgtatcttgt	tcacagaaat	tcagtgagct	tgggggagct	gataaatgtt	ttaaccatcc	3780
aatgtaacat	gttgtcatca	aagagatgg	gagactttac	acttgtgtcta	acaaggtagc	3840
tgttctacat	aaaagaacat	acagtacaga	tgtagaactt	ttctgttatc	atagaacgtt	3900

ctattggaca	gtgctagget	gaatgctaca	gatcttcaga	gaaaggagag	gttatgagge	3960
ctggagttgt	ctagaaagt	tttttggcaa	agagggattt	caactgggtc	ccaaataatg	4020
ggtggaattt	gataggtgta	aagaatttgc	ggtggtttat	gcctgtaatc	ccagcacttt	4080
gggaggctga	ggcaggagga	ttgcttgagc	ccaggagttt	gagaccagct	tgggcaacgt	4140
ggtaaaactc	cctctccoct	aaaaataaaa	aaaattagcc	aggcctggtg	gcgtggacct	4200
gtagtccag	ctactggtga	gactaaggtg	ggaggatcac	ccaagccccg	ggggttaagg	4260
ctgcagtgag	ccgtgatccc	gccaccgcac	tccagcctgg	gtgacagagt	gagaccctgt	4320
ctccaaaaaa	aaaaaaaatt	cctggtagcc	cggtagacta	ggagggttaag	taggggagaa	4380
gtgattactt	acaaaagaca	ttgaatacag	gaccaaggaa	tttcagttct	gttcttttgt	4440
aggggaagct	tttaaaactt	tcggggcgcc	gggcgcggtg	gctcacgcct	gtaatcccag	4500
cactttggga	ggcccagacg	cgcggtacac	gaggccagga	gatcgagacc	atcctggcta	4560
acacggtgaa	accccatctc	tactaaaaat	acaaaaaaaa	gtagccgggc	gttgtggcgg	4620
gcgtctgtag	tcccagctac	tcgggaggct	gaggcaggag	aagagcgtga	actcgggagg	4680
cggagcttgc	agtgagccga	tatcgacca	ctgcactcca	gcctgggcga	cagagcgaga	4740
ctccgtctca	aaaaaaaaaa	aaataaataa	ataaataaat	aaataaaact	ttggagccga	4800
agcactgatg	tttaatcata	gagtgcctac	tatgtgttag	gcacaggcct	gattgcctga	4860
tgctggttaa	tttgtacaaa	gtaaatcagt	gcatatgccc	tctgccctag	gggagttatt	4920
aactggagtc	tgacattgta	caaaggtagg	tatcctgact	agtttgattt	ggtactttgg	4980
gtgaaaaaag	tatagtgtgc	ttaagtgcag	aagtgttttt	tgaggatttt	tgattggata	5040
caaaccacca	ctcatatttt	atgtcttttg	cacttaaaaa	tttcaccata	acttttgagt	5100
cattttataaa	aaccactgaa	agagtacttg	agggacatcc	ccgaatcctg	aagaacttct	5160
ggtgttctgg	agcagcctca	gtgagatcca	ggaggatggc	attgctgggc	tggcccagcc	5220
cttatttgatt	atggtgtaaa	gaattaatat	ggtggttata	tactctttgt	tagacacctt	5280
ggcttacaag	acgtaagcgt	aaagtgtagt	gcgctttagt	cagtatggcc	acatggtcct	5340
ttggtggtaa	attgtttgag	atgcctccag	tttttaaaaag	gagtagcata	tcgggccagg	5400
agcagtggct	catgcctata	atcccagcac	tttggaaaggc	cgaggcaaga	ggattgcttg	5460
agcgttgagc	ttcaagacca	gcctgggcaa	ctagtggaga	ccactttggt	tccttaaaaa	5520
aaaaaaaaaag	gcaaaaacag	gctgggcatg	gtggctgatg	cctgtaatcc	cagcgctttg	5580
tgaggcagag	gtgagcggat	cacttgaggt	caggagtttg	agaccagcct	ggccaacatg	5640
gtaaaacccc	gtctctacta	aaaatacaaa	aattagccag	gtgtggtggc	acacgcctgt	5700
agttccagct	actctggagg	ctgagccagg	agaattgctt	gaacctggga	ggtggaggct	5760
gcagtggacc	cagctcctgc	cactgcactc	gcactggggg	gacagagtga	gacattctga	5820
cagtgtctaca	ctgaatgcta	catgtcttca	gaggaaggag	aggttatgag	gcctgggaat	5880
aacatattgga	agaatgaatt	tctgttatgg	tcagttctca	tttgtcatgt	taggattact	5940
gcaactctta	cccagccggg	tgtggtggct	catgcctgta	attccagcac	tttgggaggc	6000
tgtgggcgga	tcacgaggtc	aggagatcca	gaccatcctg	gctaacacgg	tgaaactccg	6060
cctctactaa	aaatacaaaa	aattagccca	gcgtggtggc	agacgcctgt	agtcaccagct	6120
actcaggagg	ctgaggcagg	agaatggcat	gagtcctgga	ggcggagcct	gcagtgagct	6180
gagatcgtgc	cactgcactc	cagcctgggc	aacagagtgg	gactccatct	caaaaaaaaa	6240
agaaaaaaaa	aaggattacc	gcaactcttt	aattcagatc	agcaaacatg	ttgagagcca	6300
ggtattgcgt	caggcaggat	ccaaggataa	tgaatatattg	tccgttttca	tgaaactgga	6360
gatgttgtag	ggaccgaggt	ccagtatgga	agtaggacag	agtaggacag	gggagacgac	6420
agggcagtga	gtggttcaag	actctggctc	tgaagtcaaa	cagatctggg	actgaatcct	6480
ggatctgcca	cttcctagt	agaatctgag	cctctatttt	cttatctgta	aaagaagatt	6540
ataacagtgc	ttatcttgta	ggtactgttg	acgattcaat	aagataatgt	ggataaaaatg	6600
cttagcatag	tgcctggcac	atagtaagag	ctcggtaaat	ctaagttcct	actaaatatc	6660
caagaaaaga	gattaattct	tttcaggagt	gagagaaagt	catcattatt	gaggggcttt	6720
atcagatggg	aacacctgaa	tagggtttta	taggatgaat	aggaattctt	tccacgaagt	6780
tgcgttacaa	aaagttgcat	tcaaggctga	aggaacatga	gggtgcagag	gcttaaaaca	6840
gccttgtgtg	ttcagggagc	tataagtaga	agttcttaat	ttaggagaac	taaaccaagg	6900
ggaaaggtag	ccaaggaacc	acagttctta	tcccttttct	gttaataatt	gggtttaaat	6960
gcatttaaaa	taagttatct	tgtccttttt	agaaaagtaa	taacatgcta	ttataaaaaa	7020
aaagacttgt	aggaatataa	aatgtgtgtt	ttacatgtat	cctgttaatt	gacttgcttt	7080
tattcagatt	ttttgcagcc	ctttctgttt	accaggttat	cttgagaca	tattttattcc	7140
aaattccttt	tttttttttt	ttttgagatg	gagtctcgct	ctgtcgccca	ggctggagtg	7200
cagtggcgct	atctttggct	attgcaagct	cgccctccc	gggtcacgcc	actctcctgc	7260
ctcagcctcc	cgagttagctg	ggactacagg	cgcccgccac	cacgcccagc	taatgttttt	7320
ttttttatat	tttttagtagc	gacagggttt	caccgtgtta	gccaggatgg	tctcaatctc	7380
ctcacattgt	gatccgcctg	cctcggcctc	ccaaagtgtc	gggattacag	gcgtgagcca	7440
gcacgcctgg	ccttccaaat	tccttttaac	agcctagcaa	aagaataata	aggaaggtaa	7500
atctgcccc	acaagaaaat	aatgcttcga	cgatccggct	ttccttctctg	ctacccccag	7560
ccataagaat	aaatgacctt	gctcatcact	aaaattttac	ctgacctttg	aatttttaac	7620
tgcgtcagcc	aaagaactta	tattttgagt	attcctaagg	tgattgctat	tgtagttttg	7680
aaacacttgg	ttggtatgtt	tgagggtttc	atggtccaaa	gttactatag	cagttaaaag	7740
agtggactat	caggtcagac	ctattgggct	ttaatcccag	ttctgccttc	tcttagacct	7800

tgggcctggt	gttttcactt	ctctgggttt	cagtttctct	gtccacaatt	gtggaaacga	7860
ggtccacttg	tagagtaatt	gagaggatga	agcaagatga	tgcatatcaa	gtactttgca	7920
tagtgccggg	cagacaggta	acattcaagt	gctaataatt	actattatta	ctattttattt	7980
tttgagacag	gtttctcactc	tgtcacctag	gctggagtgc	agcggtgaga	tcacagctca	8040
tgacagcctt	gacctcctag	gctcaagtga	tcctcctgcc	tcagccttcg	gggtagctgg	8100
ggctacaggt	gtgtgctacc	accctcagct	aatttttctaa	tttttttgag	tcaggatctc	8160
gtcacgttgc	ctaggctgaa	ttactcttat	taaaaactat	aatatcaggc	cgagtgcggt	8220
ggctcacgcc	tgtaatccca	gcactttggg	aggccaaggc	gggtggatca	cctgaggcca	8280
ggagttcaag	accagcctgc	ccaacagagt	gagaccccc	ccgtctctac	taaaaatata	8340
aaaattagcc	agttgtgggt	gtgggcacct	gtaatcccag	ctactcgga	ggctgaggca	8400
ggataatcgc	ttgaacccgg	gagggcggag	ttgcggtgaa	ccgagatcgt	gccactgcac	8460
tacagcctgg	gtgacagagt	gagactctgt	ctcaaaaaaa	ccgaaaaaca	aaaagcataa	8520
ttaggggtggt	aacgccttata	cataggggca	gggtggaataa	aacataatta	ggaggtcggg	8580
catggtggct	cacgcctgta	attccagcac	tttgggaggc	cgaggcgggt	caggagtcca	8640
agaccagcct	gccccaacata	gtgagacccc	gtctctacta	aaaatataaa	atttagcctg	8700
ttgtgggtggc	gggtgcctgt	agtcccagct	accggggagg	ctgaggcagg	agaattgctt	8760
ttgaacccag	gaggtggggg	ttgcagtgag	ctgagatcgc	gccgctgcac	tccagcctgg	8820
gagacagagc	aagactccgt	cacaaaaaca	aaaaacaaaa	aactgtcata	tcaaaaaacta	8880
aactaaaatg	gtaatatctg	ttagatatta	caaatgcagg	caaattatga	ttcatggcag	8940
ccactaatga	cccaaaggag	agaaagaata	attagcagat	tctaacctaa	tgggaaaaaaa	9000
actaaatgaa	tagggatggg	ggacttacat	tctgttagag	gaaattgagg	ctgtcatata	9060
aaaggaatag	gtaaggcaaa	ctgtaaattc	ctgtttacac	aaatgccctt	ctgataaaatc	9120
tctgcattgc	ccacagtcga	tgattacctc	tcccttattt	taagtaatat	ttaacacatt	9180
aaaaatggat	taccacccaa	ggaattgctc	ccgaccaga	aagtgcagg	agtgttgagg	9240
gtttgagggg	aagaggaatg	attagagttg	gttgtgtctc	aggaagaagc	caacaggagg	9300
aaccttattt	tgagtcagg	aaagaagggt	ggagtggagg	ggcatcccg	tggccaggta	9360
tgaagctggg	agctgattgc	tgcacattac	tcagctgaat	taaatgtgcc	ctcacatctg	9420
tgtgtgtgcg	tacatgcaaa	tgtacatgtg	tatgagttag	ttggaggggt	agacctttat	9480
tttctctgtc	tgtaaccttc	ctttgcaaac	taactctgat	tcagaacagt	gttgcaatta	9540
agaaccaccc	agcttgcca	tgaacacagt	tctctcacc	catctcccca	gttttagaga	9600
aggcaggaaa	gaaaaggcag	tgtttttctt	ttttcctggc	cgtatgcggg	gcagggaagaa	9660
gccagcagag	cttgaaagag	aaagtaaac	ttctgggaaa	taaacggctt	ggcttcccta	9720
ttgtggaggga	ggagtgcata	ttattagggg	gatgtttggg	tagtttttgt	agaagccatt	9780
tctgaaaact	gatttggatt	agtgaaggta	agcccaattt	aggaaaaccc	tgcccagctc	9840
gggtgcagcc	acctgtttcc	cgctttgttt	gattgatttg	attagtttgt	ggattattga	9900
cctctcattt	ttattacaag	agttggaaga	tttgagtctg	aacttgagca	cctgcttcgg	9960
tgaaagcttc	ctaaaatgca	tgttttttca	cattttttct	catgttcatt	ttgttttgtc	10020
tttttagcaaa	cactttttct	gacagaatct	aaaagcatta	gactttttct	gttttccctc	10080
tctctcccca	caatgtaatc	ttgaaaaccc	aaatgttagc	tgtgtaaat	acctctcccg	10140
taaaccaaac	aaagtgcatt	attgcattga	gttagcattg	aaatagtcgg	cctttgaatt	10200
tttttctact	tgtggtttag	acataataaa	tatttcatct	cagactgact	ttctcgaaa	10260
atcagttttg	catttggggc	tcttttcatc	agtatgttta	gggaaagcac	atttattgaa	10320
acattaacca	aaatgaaaca	taattaggag	gccgggagcg	atggctcacg	cctgtaatcc	10380
cagcactttg	ggagaccaag	gcattgtggat	tgcttgaggt	caggagtcca	agaccatcct	10440
tgcgcacttg	gtgaaactct	gtttctactg	aaaatacaaa	aaactagctg	gggtgtgtga	10500
cgcgtgcctg	taatccagc	tactctggag	gctaaagcaa	gagaatcgct	tgaacctggg	10560
aggcagaggt	tgacgtgagt	cgagatcgtg	ccactgcact	ccagcctggg	caacagagac	10620
tcctgtctcaa	acaaccaaaa	aaacaaaaac	aagcataatt	agggtggtaa	cgcttataca	10680
taggggcagg	tggaaataatt	gaagcattct	ggagccagaa	ataatcaact	gattaagaat	10740
aactctggctg	ggtgcgggtg	ctcacgcctg	taatcccagc	tactcaggag	gctgaggcac	10800
gagaatcgct	tgaacctggg	agggtggagt	tgcagtgagc	cgagatcgcg	ccattgcact	10860
ccagcctggg	ctatggagca	agactccatc	tcaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aatcctgttt	10920
ctgcagaaat	atcccaggtg	tcctgggtca	gcagtgcctc	atagattcca	cggacgttta	10980
ccctaagttt	tccaatggga	gttcatacct	ctataccag	tgagaatatt	ttctgagtaa	11040
tgggaatgag	attggagatg	tagggtagag	aagatccata	cagtctttgg	gttaaaacttt	11100
ttcctctttg	cctaggaaaag	attaatgcta	atcttaacca	cagatttgta	gtaagaatgt	11160
atcagttttg	tcattcagtt	ctagactcca	gttttcttta	ttgtaatacc	aatatttttag	11220
agtaaatttt	gaaatgaatc	agtacaaaag	atatgtagta	agtggaaagt	tagtccgcac	11280
cttatccttg	ggactctttc	ccagggacag	ctagttacct	actattttatc	tctcctgagt	11340
tacttcatat	gtatgcatgc	aaacatgtta	ttctctgggt	gttgttcctt	ccatataatg	11400
cagcaaatac	accaaactct	gtattttgct	ttttgtcact	ttatcttaga	gaataactcaa	11460
tgcaaataca	tgtgtatata	cctcatgttt	aaaaaatcta	catagtataa	ttagccaggc	11520
atggtagtgt	gtgcctgtaa	tcccagctac	tcgggaggct	gtgggtgggag	aatcacttga	11580
accctgagat	cacaccactg	gactccagcc	tggggccacag	agcaagattc	tgtctcaaaa	11640
aacaaaaaca	aaaacaaaaa	aactacagag	tagtattcta	ggctatgcat	atcataaatt	11700

tgatttccta	atgataggca	tagatgattt	gcctgggagg	caaattagcg	ttggctgtgt	11760
ctcaggaaga	agccaacagg	aggaacctta	ttttgagtc	ggttccaaag	acagaaacat	11820
tgtctgacat	ttgtttttgg	gcttatatga	ataaatctgt	acacatatat	ttttaatgtt	11880
ttaatcgtaa	tatgtatact	atgttgaaat	gtggcttttt	agttaacaga	gtgcatgttt	11940
taccccatg	cacttaaaaca	ttaaacttggg	gataattaaa	tgagtctgtc	acttggacag	12000
gcaggaattg	tacccccac	aaaccataa	accgccaatt	tttttttttt	gagacagagc	12060
ctcattctgt	tgcccaggct	ggagtgcagt	ggtgcatct	gggcccactg	taagctcagc	12120
ctcccggtt	catgccattc	tcctgcctca	gcctcccaag	tagctgggac	tacaggcgcc	12180
cgtcacaatg	cccggtcaat	tttttgtatt	tttagtagag	tcgggggttc	accatgttag	12240
ccaggatggt	ctctatctcc	tgacctgtgt	atccgcccgc	tttggcctcc	caaagtgtgt	12300
gaattacagg	tgtgagccac	cgcacctggc	cggttttttt	tttttttttt	gagatggagt	12360
cttgctctgt	tgccaggctg	gagtgcattg	gcatgatctc	cgtcactg	aacctccacc	12420
tcctcggttc	aagtgtattct	cctgcctcag	cctcctgagt	agctgggact	acaggcgtgt	12480
gccaccacgc	acagctaatt	tttctaattt	tagtagagat	gggttttcat	taataatcat	12540
taatattaga	caactgtcag	actcacagtg	gtggatacaa	actttctcaa	attctgattt	12600
ttactctaaa	gctcaaat	tatcattggc	aacaaatatt	gtcagttgct	ttccctgaac	12660
agacagcttc	ccttctttca	tttttgagaa	aatatctgcc	agtatcccag	ttggtttatc	12720
aatcattcct	tctctttttt	tttttgagac	ggagtctcac	tctgtcacc	aggctggagt	12780
gcagtggcat	gatctcggct	cactgcaacc	tcacacctcc	aggttccagc	aattctctgt	12840
cctcagcctc	ccgagttagt	gggattacag	gggctagcag	ccacacctgg	ctaatttttg	12900
catttttagt	agagacagg	ttttaccatg	ttggccaggc	tgatcttgaa	ctcctgacct	12960
catgatatgc	ccaccttggc	ctcccaaagt	gctgggatta	cagggtgtgag	ccattgcgcc	13020
cggctctatt	atcttctttc	tttctttctt	tttctttttt	ttttttgaga	tggagtttcg	13080
ctcttgttgc	ccaggctgga	gtgcaatggc	gcgatctcgg	ctcaccacaa	cctccgcctc	13140
ccgaattcaa	gtgattctct	tgccaaagcc	tcctgagtag	ctgggattac	aggcatgtgc	13200
caccacaccc	gtctagtttt	gtatttttat	tagagatggg	ggtttctcca	tggttggtcag	13260
gctggctctg	aactcccaac	ctcaggagat	ctgcctgcct	cagcctccca	aagtactggg	13320
attacagttt	tgagccacct	gaccgggttt	gcttattatt	tcttttaaat	ttaaaaaag	13380
ataaataaag	gggcatgag	agcgaagagt	ttgagaaagg	ttggtctaaa	ggttttaaca	13440
taagaatccc	tgggttattt	gcttaaaaag	aagaaagaat	ctatggatct	gcctgagagg	13500
gtctgatgta	gtttatctgg	ggtcatcctc	acaggcatag	cagatattct	gattcagatg	13560
gtccttggtc	cttagtttga	gaaatgtggc	tttacaaggc	ccatagaata	taaagtcttc	13620
tttgatttag	ttaagtcattg	tcacacagg	ttagaaaatg	tttttgtttt	agagataaag	13680
gtaagtggaa	gagttagacat	gtagtgaatg	agggaaaatg	tttttagagat	ttctttttat	13740
tctgtttact	cttcttggtg	tgacgctacc	tgaatattaa	ggatatttta	tgaagtcatg	13800
acattaccag	attaatgttg	gttttgtttt	aaggtagctt	ctgactgctg	gggttaattc	13860
ctacagacga	ttctgggttaa	gaatagcctt	taagttttaa	aagtgttgac	ttatttcaga	13920
tgtcttaata	aagttaactt	ccagttatta	catgtaacgt	atataaagct	ctcattttcc	13980
tttattctcg	ttaatgtttt	gcataacaaa	ttcaaaggga	aatttgcttg	gcagagatca	14040
gatagcagag	atgagattta	aaaacaggta	atgttggtac	tagcctggga	gtttgaagat	14100
tccaagtgtg	catccatgtg	tagtcactta	acatttctgt	ccttatctgt	aaatgggaat	14160
aacacctact	tgatagggtt	gttacattat	cttggccacc	tcaggttctc	tttggtctgag	14220
tgattgactg	gaaaacgcaa	tgtgaattca	tgcttcagac	tgggttcttt	tttttttttt	14280
tttttgagat	ggagtttcac	tcttattgcc	caggctggag	tgcaatggca	cgatctcagc	14340
tcactgcaac	ctctgcctcc	caggttcaag	cgattctcct	gcctcaggct	cccgagttagc	14400
tgggattaca	ggcatgcacc	accatgcctg	gctaattttt	ttgtattttt	agtagagacg	14460
gggtttcact	gtgttggtca	gactggtttc	aaactcctga	cctcagggtga	tcacacctgt	14520
tcagtcctcc	aaagtgtctg	gattacaggc	atgagccacc	gcacccagcc	caggctagggt	14580
tctatatggg	tgtgcttttt	agaatttaga	tcactgggcta	tccccaacac	aaactggata	14640
atgtttcttt	ctagattctc	tctaagcgtg	tattctcttt	ctttcctagg	cacagccacc	14700
acttcactta	cattgtggga	ttataatttc	atgagtagtg	gaatttcctt	aaccttctct	14760
tgtgtgggag	ctgaaggaca	aaatgagata	ttctctgaag	agtggttaca	tcatgcaaaa	14820
ctatgatgtg	taatgaggtc	acttagtttt	ctaagtacat	tatacatttt	gataagattt	14880
tcatagaaaa	gcttgtctcc	ttggggagat	cactcatctt	ccatcttgac	tattatttaa	14940
actttatggg	tcagatttat	cttttttaaaa	acttaaccat	aaagctcaat	taattttttt	15000
tttttttttt	tgagacggag	tctcgctctg	ttgcccaggc	tggagtgtag	tgggcgcatc	15060
tcggctcact	gcaagctctg	cctcccagg	tcatgccatt	ctcctgcctc	agcctcctga	15120
ctagatggga	ctacaggcgc	ccggccagat	gcccggctaa	ttttttgtat	tttttagtaga	15180
gacgggggtt	accggtgta	ggatggctct	gctctcctga	cctcgtgatc	cacccgcctc	15240
ggcctcccaa	agtgtggga	ttacaagcgt	gagccaccgc	gcccggctca	attaatatat	15300
tttaaaaatt	aatagacttt	attattttta	ttttattttt	tttttgaggc	agagtctcgc	15360
tctgtcacc	aggctgagtg	cagtgggtgtg	atcttggtct	actgcaaaact	ccacctcccg	15420
ggctcaagt	attctcctgc	ctcagcctcc	taagttagta	ggattacagg	tgctgcccac	15480
cataccggc	tagtttttgt	aatttttagta	gatacgtgtt	ttctttcttt	ttttttcttt	15540
tttttgagat	ggagtttcac	tctttttgcc	caggctggag	tgcaatggca	tgatctcggc	15600

tcaactgcaac ctccgcctcc cagggttcaag tgattctcct gcctcagcct cccaagtagc 15660
 tgagattata gttgtctgcc accacgcctg gctaattttt tgtatgtttg atagagacag 15720
 ggtttacta tgtagccag gatgtctcga tctcttgacc tctgtatccg cctgccttgg 15780
 cctcccaaag tgctgggatt acaggcgtga gccactgcgg ccagtctaga ctttattttt 15840
 taaagcagtg ttagttttac agaaaaatta tgtggaaagt acagagagtt tccatatacc 15900
 ccttactttc tcccacaact tctattatta acatcttgca ttagtatagt acgtccctta 15960
 caactaatga accaactcga tacattatta ttaaccaa tccctgagttt attttatttc 16020
 tattttttatt ttattattat tatttttttag aggtagggtc tcaactgtgt gtccaggcca 16080
 ggttgcaagt gcatcatcat agcttgctat agcctgaaac tccctgggtc aagcaatcct 16140
 cctgcctcag tctcccaaag tgttgaatt acagggtgtga gccactctgt ccagcctgaa 16200
 gtccatagtt tacattacat ttcaactctgt tgagcattct atggattttg acaaatgtgt 16260
 gatgatgtat atttgccagt acacaattat ataaaaatgt tttactgccc tagaaacccc 16320
 ctgtgctcca cctattcatt cctctgctga accactggca accactgatc ttttataata 16380
 tctccatagt tttgtctttt ccagaatgtc atatagttgg acatacagtg tgtagccttt 16440
 tcagattggc ttctttcagt aaatgatatg catttcaggt ttcttcatgt tttttgtgg 16500
 cttgataggt tgtttctttt cattgggtgag taatactcta ttgtatggat ataccacatg 16560
 ttgtttatca aacattcacc tgaaggatag acatcttggg tgcttccaag tttgagcagt 16620
 tatgaataaa gctgctataa acattccagt gcaggacttt tcacctcctc tggataaaa 16680
 tcaaggagt gcaattgctag atcatatggg aagagtatgt ttagttttgt aagaagctat 16740
 caaactatat tcaaaagtac tgtaccatta tacattccca tcagcagtga gtgagagttc 16800
 ctgttactcc acatcttcac cagcatttag tgggtgcagt gttttggatt ttagccattt 16860
 taatgggtgt ataatggtat acctattaaa attgggtttt tttggagaca gaggttcaca 16920
 gtttcaactc tgttgccctg gctggagtgc aatggcgcaa tctcggctca ctgcagcctc 16980
 cgctcccag tttcaagtga ttctcctgcc tcagcctccc aagtagctgg gattacaggt 17040
 gcacgccacc atgttctgct aatttttttg taatttagta gagatggggg ttcactgtgt 17100
 taccaggct ggtcttgaaac tccctgagctc aggtaatcca cctgcctcag cttcccaag 17160
 tgtaggatt acaggcatga gccaccgcac ctggcctcaa tttttttttt tttttttttg 17220
 agacagagtt ttgtcctgtg tgaccaggct ggagtgcagt ggcacaatct cggctcactg 17280
 caacctccgc ctctgagtt caagcgattc tccctgccaca gcctcctgag tagctgggat 17340
 tataggcgcc cgccactacg cctggctaatt tttttttttt tttttaatta gagacgaggt 17400
 ttctccatgt tggtcaggct ggtcttgaaac tccccgttct caggtgatcc gcctgctca 17460
 gcctccaaa gtgtgagat tacagggtgt agccaccgtg ccccgctgt tttggctttt 17520
 actgtgaaga cgtgttagcc gctgtgatga ctgcaagtg tggccctcca cccagtcgct 17580
 ctgggctccc agctcctgca tccctgctgca aacttgacat cttccctcaa gtaacttcta 17640
 gttgtctctc gtctacttgc ccaaaatata actcttaaac tttctctct gcaagtttgt 17700
 gcctctctcc ctgtctgact tcccatcta aataaattgg agaccacat ctactcctt 17760
 gtgcaagcca gaaatctagg aatctcctt aaattccctg ttctgtotta tctctgctt 17820
 cattcaaaag atcagcaaat cctgttggtt ctacctctga agttttctca aatactgtta 17880
 cttgactcat cctgactttt gtttctgctt tatgttaggc taaatgcctt gaaaactctt 17940
 ttgtacaaaa cactagaaa tactggataa actgggctta acaggagggc ccggtgtggt 18000
 ggctcacgcc tgaatccca gaactttggg aggccaaagt ggggtgatca cctgaggtca 18060
 ggagtcccag accagcctgg ccaataccta gtgaaacccc acctctacta aaaaaaaa 18120
 aaaaaattag ctgggtgttg tgggtgcacac ctgtagggtg tgcatgcttg aacttgggag 18180
 gcggaggttg cagcgagctg agatcgcgcc actgcacttc agcctgggtg acagagcagg 18240
 attctgtctc ttaaaaaaaa aaacaaaaaa agaaaaacag gaaaatcttc agaagcaaaa 18300
 accaaacaat ctaccaaag aaatgagaag atggctgggc gcggtggctc acgcctgtaa 18360
 tcccagcact ttgggaggcc gaggcgggca gatcaccgca gatgggcaga tcacccgagg 18420
 tcaggaattc gagaccagcc tggccaatat ggtgaaaccc cgtctctgct aaaaatacaa 18480
 aaattagcca ggtgtggttg caggcgctg taatcccagc tactcaggag gctgaggcag 18540
 gagaatcgct tgaacctggg aggcggaggt tgcaagtgag cgagatcatg ccactgtact 18600
 ctgacctgga cgacagagca agactctgtc tcaaaaaaaa aaaaggctgg gtgtggtggc 18660
 tcatgcctat aatcctagca ctttgggagg ccaagggtgg cggatcactt gaggccaggt 18720
 gaacatggcg aaaccccatc tctactaaaa atactaaagt tagctgggca tgggtgtggg 18780
 tgctgtaat cccagctact cgggaggcga ggcaggagaa tcgcttgaac caggaggtgg 18840
 aggttacagt gaaccgagat ctgcgcaccg cactctagtc tgggcgacag agcaagactc 18900
 cgtctcaaaa aacaacaaca aaaaaccaac acatggccaa agtgcaagtga cttacatctg 18960
 tataatccca atgttttggg aggtgagggc aggaggtatc cttgagtcca ggaatttgag 19020
 accagcctgg gcaacataga cctcatcacc aaaaaaaaaa tattttttta ttagctgggt 19080
 ttggcagcat ttactgttag tctagctac tcaggaggct gaggtgggag gatcacttag 19140
 gccagggagt gtgatgttc gaggttatag tgagctatga tccctgccact gcactccagc 19200
 ctgggccaca gagtgaagcc ctgtctctta gaaacaaaac aaaacaaaaa aaagaaactg 19260
 aattaaaaac aacaagaaca aaaatgctgc tttttgttat tgagttgtag cccaagtttc 19320
 ttgagggtaa agcattgaaa agcaggcagt aatagatttg ctgtttaaag agatttactt 19380
 gcagcactat tcacaatagc aaagacatgg aatcaacctt aatgcccatc agtgacaaat 19440
 tggataaaga aaatgtggtt catcacctgt ggaatactat gcagccataa aaaacaacga 19500

gatcatgttt ttgtttgttt gtttgtttgt ttgtttttga gatggagtct tgctctattg 19560
cccaggctgg aatgcagggtg gcacgatttc agctcactgc aacctccgcc tcccagggtc 19620
aagcaattct ctgcctcagc ctcccagata gctgggatta cagggtgccct ccaccatgcc 19680
tggctaattt ttgtatttct agtagagatg gggtttcacc gtgttgggca ggctgttctt 19740
gaactcctga cctcatgata ctcccacctc ggcctcccaa agtgcgggga ttacgtgtga 19800
gccaccgtgc tcggctgaga tcatgttttt gcaggaacat ggatggagct ggaggctatt 19860
atccttagca aagtaatgca ggaacagaaa accgaagacc acgtgttctc acttataagt 19920
gggagctaaa tgataaggac ttgtgaacac aaagaaggaa accacagata ctgggggttt 19980
cttgagggtg gagagtggga ggaggggagag gaacagaaaa gataactatt gggatttggg 20040
cttaatactt aatattttat caaaataagc tgtacaacaa acccctctga catgagttaa 20100
cctatataac aaacttgcac gtgtaacccc aaacctaaaa taaaagttaa aaaaaaaaaa 20160
aaaggctggt tgcatgtgga ggctgaggca ggcagagcac ttgaggccag gaattcgaga 20220
ccagcttggc taactgtggag aaacctgtgc tctactaaaa attcaaaaat tagccagggt 20280
tggtgtgtca tgctgtcagt ccagctacc agggaggctg aggcaggaga attgcttga 20340
ctcaggaggc agaggttgca gtgagctgag attgcaccac tgcattccag cctgggagac 20400
aggcgagac cttgtctcaa aaaacaaaaa aaaaacctgt cactttggga 20460
atatctcaaa cctagtcac caagtgtgtg tacgatttta gtgtctgcat atcaatattt 20520
agtgtgatct actttcttag attctcaaat actgccaatg ggcacatgtc atgaaataat 20580
gtcctttaga ggacaagaga gtgctaaagt ctcatattg cagttaaaga aaaacaattc 20640
tgtaacagtt taactttata ggaatgcct tttgtttatt tatttttttt cttttgaggc 20700
ttgaattttt atttttatgt ttttagagat ggggtcttcc tatgttacct aggctggcct 20760
tgaattcctg ggctcaagt atcttctctc ttcagcctcc tgagtactg ggactagacg 20820
tccactactg ctctctggct gaagttaga ttttaattta aactcttcta ttgggaaact 20880
ttgtatgttt gctttaccac ttaacatttg catgcattat tgtacctatt gtctcctact 20940
taagggaagg cagtttatgc tgttatatga cctgaattaa cctcctatgg tacttcagtt 21000
ttctctatgc taaaagtgtg ttctagattt ttgaaaaact tacttaattt tcattcattt 21060
attcaaatat ttgagcattc tgtagtgtct ggggaaatag cagtgaactg aagaatgtct 21120
ttgttcttat ggggttaag ttctagttg atcatattgg aaggagatac atgaaaaaag 21180
aaatatatga acaatggagg gcgatgagta ctgtaaggga gaattcagca ggggagatgt 21240
tgctgtttta gatagagggg tgtcaagaga cattgtgcag agacctgaac gaagtgaagg 21300
agcaagccat ggagatatct agggaaagag cctatcaggt ggagagaaga gtcttagggc 21360
agaaacgggc aaggtgtgtt ccaggagcag agaggggaca gctgtgagca aggggagagt 21420
tgtaggggag gaggcaagga gagacatctg gggcaaatg gattgactgg tgggcccgtg 21480
taggactttg gattttttcc tgagtgggtt ttgagcaggg gaataaatg atctgactct 21540
ggtttttttt ttttttggag acaaaatctt cctctgttgc cgaggctgaa gtgcagtgcc 21600
gcaatctcgg ctcatgcaa catctacttc ctgggttcaa gctatgctcc tgcctcagcc 21660
tcccagtag ctaggattac aggcctgggc caccatgccg gccaatttct gtttttattt 21720
ttatttttta tttattttta tgtttatgtt ttttgagacg gactctcgct gtgtcaccca 21780
ggctggagtg cagtggcgcg atctcagctc actgcaacct ctgcctccc ggttcaagca 21840
acttctctg cctcagcctc ccgagtagct gagattacag gcgcctgcca ctacacctgg 21900
ctaatttttg tatttttagt agaaacggga tttcaccttg ttggccaggc tggctctgaa 21960
ctcctgacct taatttatct gctgccttg gcctccaaa gtgctgggat gacaggtttg 22020
agccaccgtg ccagccagga ctcttatttt gaaaggatct gtaatgtgga gaatagaagg 22080
tagagggaca aggatgaaag catccaggcc agttagccta gtccagctat ctaggtaaga 22140
gatgctggtg gcttgattat aggcctgcgtc agtgggaggt tgtgagaaag gctcaccttc 22200
cttttttttt tttttttttt tttttgagac aggatcttac tctgtctccc aggctggagt 22260
gcagtgtgtc aatctcagct tactacaacc tccgcctcct gggctcaagt gatacccca 22320
cctcagcctc ccaagttagt gggatcacag gcttgcgcca ctatatccgg ctaatttttg 22380
tatatttctg agagacagg ttttgccatg ttgcctaggg tggctcaaa ctcctgagct 22440
caagtgatcc acccgctca gcctcctaaa gtgctgggat tataggcctg agccattgtg 22500
cccgtcact tccagatttt gaagacagag ccaacaggat ttgttaatgg attaggtgtg 22560
gcaggaggag ggggaggaag agagagagag actggagttg aagttaaggc tcatttcaag 22620
gttttttagc tcaacatgtg caggaatgga gttgtcact gctagaatgg gggagactgg 22680
aggagaagcc ggctgggaga ggtttttaat gaaggggttg gctttggata cattaagttt 22740
gacatgcatt ttagacatcc aggtggagat attgaagagg cagttggcta taagtgtctg 22800
atgttcatat tagcggatgg ggctagagac ataaatttga gaattgtcag tgtataaacg 22860
ttgttttgaa agaaagtggg gctgaataat ttagaaggga gtgcatagag aaaataagtt 22920
tactattaaa atagctttaa caggccgggc acggtggctc atgcctgtaa tcccagcact 22980
ttgggaggct ggggtgggca gatcaaaagg tcaggagttt gagaccagcc tggccaatat 23040
gggtgaaaccc tgtctctact gaaaatacaa aaattagcca ggcgttgtac cgggcacctg 23100
tagtcccagc tacttgggag gttgaggcag gagaatcact tcaacccggg aggtggaggt 23160
tgcatgagc caagatcacg ccactgcact ccatcctggg caacagagca agactccgtc 23220
tcaaaaaaaa aacaaaaaaa aaaaaacttt aacagcaaag cctcttctt 23280
taaaattatg aatttttttc ttatggaagt tggactctt cattattaag tctacattca 23340
atcactatgt tagtaaaaat gttgttctag ttgccgaatg caataaacca gctcagactt 23400

agtggcctaa	agcagcaatc	atttgactat	gttcgaagat	gccgtgggca	ggaatttaga	23460
taacagcagg	gatggcctgt	ctttgctctg	cgatgtctga	ggtctcactg	agaaaaactca	23520
agcggctggg	ggtaataatc	atctggaatt	ttctttactc	ctgtatctga	tgtctgggct	23580
gcgatgactc	aaaggctgat	ttcagctgag	actgtagacc	acgtgcctac	ttgtggcctc	23640
cccttttgcc	ttgggtttct	cacagaatgt	ggctggttct	ggagaatgag	acttccaatg	23700
aaatcagggtg	gaaatgacat	ctcgccgctt	tcagcatgct	ctattgggtg	gaacagttat	23760
ggacttagct	agattcaaaag	gaagggaaca	aagacccct	cctctcagag	agtggggcat	23820
aatgagagaa	tttagggcca	tgttatccaa	ccaccacaaa	tgccttctga	atttgagggt	23880
ctgcctcaaa	agttcatagt	tcttttgact	gaaggacttc	tatatatcca	agcatcgtca	23940
gccccaggta	tattgttcca	tgtaatgac	caggactacc	ttagtatttc	gtatagggaa	24000
agtgcactga	ataaatttga	gaaaagaatc	ttccttctct	ccagtaagca	ctgaggtaag	24060
cattgagcca	tattataggt	ttatgacttt	gagactcaga	aatttaaatt	cttggccagg	24120
cgagtggtg	cacgcctgta	accccaacac	tttgggaggc	caaggcaggc	agatcacttg	24180
aggtcaggag	tttgagacca	acctggccaa	aatgggtgaa	ctccatctct	acgaaaaata	24240
caaaaatttag	ccaggtgtgg	tgccggggcac	ctgtaatccc	agctacttgg	gaggctgagg	24300
taagagaatg	gcttaagtct	tctttatctg	ctttatttca	gttgccctct	ttagatgaat	24360
atlaaatgact	tacatagcat	tttagatcag	tggatgtttt	tgtgattctt	ttatttgagc	24420
tttggccaaa	gataacagta	cccacagggt	ttttccagct	actcgtctct	ctcccttcag	24480
tggccctcga	gcctggaaaa	tctgacatga	caatgtgctt	gctcaacctc	ccactgtttt	24540
tcttttgaaa	agtttgccag	cctgtttctg	actcctatga	aggtagaattc	ctcagcattc	24600
acagtttatt	agaaaaatc	tttgcttctc	tccaaactcg	aaattcaaga	taaccaaaac	24660
tatatatagg	ctgatctttc	aggatgcagt	tgtcatgttg	atgccatgct	tttcagtatc	24720
gtggccatca	tctgttcagt	aggggaggtg	tacttctgta	atgggaggtg	gtggttatgt	24780
gtgtgtgcaa	gtgtttattt	ggtgtcttaa	gttagcctgt	gggaagttct	aaatcaggat	24840
ggtacgtggt	tgccagcaga	gagctgctcc	tcaagtgaag	gaggtagaat	caaagccaat	24900
aggaaagagc	ctcagatgct	tatatatgta	ccgtggggat	tcagagtga	agcagtcatt	24960
ggactagggg	tgggggttagg	gagagcctgt	ctgacagaca	caagaaaggg	atggataacg	25020
ccaccagag	aaaaaagcat	tttaggcaag	aacaaatag	aaaaagggaac	aaagtctgtg	25080
ggtggggggc	aaggaggaga	taagttgact	tgaaggga	caacacttat	gaaagtcacc	25140
tggaggctgg	gtgccatggc	tcatgcctat	aatcgagca	ctttgggagg	ccgaggtagg	25200
aggacaactt	gagcccagga	gttcgagacc	atcctgggca	acatggtgag	actgagctct	25260
taccaaaaaa	aaaaaataaa	gaaaattatc	cagacatggt	ggcatgtgcc	tgtaatccca	25320
gttactcagg	aggctgaggt	gttagcccca	gttagcccca	ggaggttgag	gctgcagtga	25380
gctgtgatcg	tattattgca	ctccagcctg	ggtaacagag	caagaccctg	tctcaaaaaa	25440
tgaagtcatt	ctgtaggctg	gagagaggaa	ctggaagggg	ctaaagttgg	ctgagtagtt	25500
acagagcctg	agataagggt	aaagattttg	cattggacaa	tgagatgta	gtgtgtgttt	25560
ttgagctggg	gagtgtctgt	attttactct	tattgaagaa	tactgaagg	attattcttg	25620
aatcagtgat	tcttgatcat	tcttgaattt	ttcaaacagc	aaaactggaa	gagttggcct	25680
attcctcaga	atattttcta	attgggcgca	gtgtcctcac	ttgggagaa	ctggctacac	25740
acttttagttg	taattcactc	cagtcgttca	ttcattcaat	acctattttt	tcagcaacct	25800
ttatgagcca	gacactatgc	tggatgccag	ggttcagggt	aggacacgct	agtgcagaaa	25860
agccaagact	cttcttctct	tcatggggct	ttcagtcag	catagtgtgt	atgagtccaa	25920
gttaattggag	tcacagta	tgggtgcaag	tcattggtgat	ggtgatagaa	ggaaggcatg	25980
tgtgagggcc	agtggcaggc	aggagcctgg	tgtttttgag	gacctgaaga	aggagcagag	26040
tgagtgcag	gaacttagcc	accagctggt	accagccata	cgagaggggc	agagccagcc	26100
aggatgtcgg	tcatgctagt	aatgagtaca	aacacttaca	tgtctcacgc	tattgggctc	26160
ctgagtgtca	cgtgttcatt	agctcgatga	atttgtacag	caaccctgtg	aggtaagcac	26220
tgttctctcc	cctttctata	gatgaggaaa	ttaaggcaca	aagaggataa	ataactggca	26280
ccagctacac	gctaagtgtat	cgaagtgggt	gaaccaggat	tcaaatccat	gctattctgc	26340
cttaagataa	caaactctgt	tttttagcct	agaacagag	cagtcatcag	gagggtttta	26400
agtaggggtg	tggcaagatc	aagtttgtgt	cttgaaaagg	tctctctacc	cacagtgtgg	26460
aaaatggcct	ggaggcaagc	acacagatgt	tgggagacag	ttacagctc	ttgccatggc	26520
ccctatgca	ttttggctct	gatgtttctg	cctgattttt	ctcttgccct	tgcctctttt	26580
cctgagggga	tggcagggtt	taccattcag	ctggagtaca	aaccctgaac	cctttttggt	26640
taaatatcta	cttgcttttc	ctacagtatt	attttgagtt	gctgtggctg	taatgtcttg	26700
aggggaatcga	gcttgacagt	aatttataga	acaaacagtt	tttagagact	gtgtggccca	26760
attgcctctc	caatgttggc	actcctgcca	tgacatttac	catgctgagc	atgtgaccgc	26820
catctgaata	ccaaatgcca	caggaaacctg	ggaggtgtgc	acttactcct	ccctttctct	26880
gagctcacct	tgccttccag	tcagtcacca	agtcctatca	catgtagctc	tgtaatgtca	26940
cagaagatgg	atgtctgcct	caaaacactt	acaatgctgc	tacctaatt	gggcagccac	27000
gacctccac	caggattatt	gcagcctgag	ggatcttttt	gaaatgtaaa	tcaaactatc	27060
acttgtctgt	ttaaagcttt	tcaaagactt	accccatgct	ccttggaaga	aagtgcagat	27120
atcttgacag	gagagccttc	tccagcctcc	tcttctgccc	tggctcctct	gtacagctct	27180
tacagtgtac	tgcttcatta	gaaccctgga	gctatttatt	tgtagtctct	gggctaagaa	27240
ctggcacctg	gctttgtaga	gctcctcagg	agattctgag	gcgtattcag	agttgagccc	27300

tgatctctgc	tctgatttcg	aggttctcgt	tatatattatt	aatgatcacg	aaaaaattta	27360
ttattattct	ttggcctcac	tttagcatca	tctgaggaat	tttttttttt	ttttgacaga	27420
gttttgctct	tgttgccag	gctggagtgc	aatggcgtga	tctcagctca	ctgcaacctc	27480
cgcctcccgg	gttcaagaga	ttctcctgcc	tcagcctccc	aagtagctga	aattacaggc	27540
atccaccacc	atgcctgcta	atgtttttgt	attttttagt	agaggtgggc	tttcacagtg	27600
ttggtcaggc	tggttttgaa	ctcctgacgt	cagctgatcc	acccacctag	gccccccaga	27660
gtgctgggat	tacaggtgtg	agccaccgtg	cccagccgta	gctttcgaaa	tttgaaacct	27720
gggtccactg	tcagaggttc	caatttgcca	ctgggttggt	tcccaggcat	ctttcttgct	27780
gtatatattt	tttagtgtca	gccagggtgg	agacctctgt	attacttcat	ggggaagaat	27840
ttggggagaag	atgtttgtgag	gagacaggtt	ctagtccctag	agtgttttat	cctttctcgt	27900
acagattttc	aggtattttga	ggggccactc	ttctgtaatt	catgtttttc	tctcctaacc	27960
tcactcctgt	tgctgcatac	ttcttgctga	gcaaaatatt	caaggtcttc	aactcctcac	28020
accctgggtg	tcctccctg	gatgtgtttg	gttgttttag	tgttccattt	caattttgat	28080
acacagaatt	agaatagcat	ccagatgtgg	gtctgttaca	gctagactac	tagatccttc	28140
aaaatccaag	tactagtatg	tctattaaaa	taccataaga	tcacattggc	tagttacaat	28200
gggtgggttg	tgggttactt	aaaaatcaac	taaaattctt	tttttttttt	tgagatggag	28260
ttttgctctt	gttgcttagg	ctggaatgca	atgacacaa	cttggctcac	tgccacctct	28320
gcctcccagg	ttcaagcaat	tccctgcct	tagcctcctg	agtagctggg	attacaggca	28380
tgtgccacca	tggccagcta	attctgtatt	tttagtagag	atgaggtttt	tccatgttgg	28440
tcaggctggg	ctcgaactcc	cgacctcagg	tgatccacct	gcctcagcct	cccaaagtgc	28500
tgggattaca	ggcgtgagcc	actgagcctg	gccaaaattc	ccactttcta	atactcctgt	28560
agtagctggg	tacggtgggt	cacatctgta	atccagcac	ttttggaggc	tgaggctgga	28620
ggatcgcttg	agcctaggag	ttcgagacca	gcctgggcaa	gatggccaga	cgccatctct	28680
aatttaaaaa	aaagaaaaaa	caagactcct	atagtgttga	agaacagaca	ttccgaaaaac	28740
agactgtgcg	ttatgattcc	agctccatgc	ctttactacc	tgtgttgtga	ctttggataa	28800
atcacttaaa	aatctttttt	tttttttttt	ttttttgaga	cggagtcttg	ctctgccgcc	28860
cagctctggg	tgcagtggcg	cgatctcgcc	tcactgcaag	ctctgcctcc	caggttcaca	28920
ccattctcct	gcctcagcct	cccaagtagc	tgggactgca	gggtcccggc	actacacctg	28980
gctaattttt	tgtattttta	gtagagacgg	ggtttcaccg	tgttagccag	gatggtctcg	29040
atctcctgtc	ctcgtgatcc	accgcctca	gcctctcaaa	gtgtgggat	tacaggcgtg	29100
agccaccgca	cccgcccaaa	tcacttaaaa	ttctgtgcct	cagttttctc	tctgtaaagt	29160
gggataaaaa	tagtacctat	ctgatagggt	tgttacaatt	atgaaatgag	caaataagta	29220
tgtcaagtgt	ttaaaaacagc	gcctggcttc	ttgtaaaaag	tgctatataa	atcatagcta	29280
taatcattac	ttattttcgac	tgtcttttaa	ccaaggttct	tatttttcat	ctttttcttt	29340
tgttttgaat	atcacttagt	gttttcacct	tttactcttt	ttaggaccta	gagccatcct	29400
aggtgaaata	cgtatggaga	tatttgatca	ggtcaccacc	cagctctcct	gacctccctt	29460
ctctccttaa	attaacatgc	caaatacacag	catcactgac	tccttccttc	ccgatatgat	29520
aagagtgtgc	attgaaatgc	atgtatttta	cttagcaggg	aaagctgatt	agtgattatc	29580
acacttaacc	cctagtgaat	ctgatggatt	aacctgcttt	ccaggacact	aaggaaatgg	29640
gtttaagata	agaaatatct	ggctgggtgc	gggtggctta	cgctgtaat	cccagcactt	29700
tggggaggccg	aggtgggcag	atcacgaggt	caggtgattg	agatcatcct	ggctaacacg	29760
atgaaacccc	ctcttttacta	aaaatacaaa	aaatttagccg	gggtgtgggtg	cgggcgcctg	29820
gagtcaccagc	tactcgggag	gctgaggcaa	gagaatggtg	tgaacccagg	aggcagagct	29880
tgcagtgagc	tgagatttgt	cccaccgcat	tccagcctgg	gcaacagagt	gagactacat	29940
ctcaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aagtaagaaa	tgtccatgaa	agggagaccc	tgggggaaag	30000
gaacaataac	tgcagctctg	aggatctggc	accagcagca	ccagcacaga	gggatgctgt	30060
acaaccatta	ttgatttttaa	ctttacaaca	gttcttcaaa	ggagagagag	ttccctgttt	30120
tactgaagag	aaagcccatt	tggtagtgaa	ataccattcc	caaagacaaa	tagetaataa	30180
atgtcaggca	gggtttttgca	cccaggccca	tccagctccc	gtctctactg	tcctttcccc	30240
cacaccacac	tgatacacag	gaatgtgtct	gggtggggaa	gtggaagtgt	tcccaagtgg	30300
ggaggtcatc	tgatgcacaa	atttgggtctg	ttttgtgggt	tttcttggtt	tagtttttag	30360
ttttgttagg	ctcagacctg	ttcttaggca	gctttaacaa	tcaactgtgc	actcagtaat	30420
tgacaaatca	tgtttgtttac	ttttaattta	gagggaaatta	ggtttgttaa	gctcttgctc	30480
cttcttttaga	gatgggtgtc	agctctgtca	cccaggctgg	agcgcagtgg	tatgatcaca	30540
gctcactgca	gtctcaatct	gctcaagtga	tcctcctgcc	tcagcctcca	tgggactaca	30600
agcatgggccc	accatgctag	gctaatttta	aaaaaatttt	tttgtagagg	caaggtctca	30660
cgggtgttgc	caggctggtc	ttgaactcct	gagctcaagc	aatccctctt	ccaccttggc	30720
ctctcaaggt	gctagaatta	taggcagtag	ccaccatgcc	tggcctttac	ttctttcata	30780
tattcaaat	ttgtcatatt	agtagggaac	tataactcaa	gttttcttat	agattgatgt	30840
tcattttttac	aagcttgatc	gtcattgggt	tttaatttta	aagcaaatcc	tgttatatgt	30900
aattgaacat	tacagtaatt	atagtaattt	gtttcagatt	gggcaactca	gtgttaatat	30960
tttgtctctt	taggaaatca	aaactagatt	tatatataga	cttcttattg	caagtatcta	31020
gtcttaaatc	ttacaagggt	actatttggg	cttaaaacta	tgaatttgtg	tgtttactat	31080
ataagtgtac	ttatttttag	ttatgtttta	aacttgaaat	tccattctta	atgtctagag	31140
taattatgaa	tggttaaatt	atgaatgact	ctaatagttt	aaagctacag	tatttatatta	31200

tttattttatt	taattttattt	tttgagatgg	agtttcgctc	ttgtcgccca	ggctggagtg	31260
tagtggcacc	atcttggttc	actgcaacct	ctgcctcgcg	ggttcaagt	attctcctgc	31320
ctcagcctcc	caagtggctg	ggattacagg	tgtatttcac	catgcctggc	taatttttgt	31380
atTTTTtagta	gagacaggct	tttgccatgt	tagcctggct	ggctcgaac	tcctgacctc	31440
aggtagacct	ccctcctcag	cctcccaagg	attacaagca	tgagccacca	cacctggcct	31500
acagtattttt	aatgtggact	ctctgtcatc	cattatgctg	tttatcctgt	ggtgaaaatt	31560
ttatgaagat	tgaatgtttt	tctctagcgt	gaattgcttt	ctcttacttt	tctcatTTTT	31620
ttccttccta	atctacttgc	agatacttca	gattattttt	agaacgtggg	atggtagaga	31680
caaataaaatt	gggggtttcca	aatcttaata	aattatgtgg	ccctcagtgg	gattagcagg	31740
gttgatttga	aaacaccaat	agaaacaaaa	tagttctttt	atgcgcttta	aataaaaaatt	31800
tcttttcagg	ccaggcgag	tggctcacac	ctgtaatccc	agcaccctgg	gaggctgagg	31860
caggcagatc	acctcagggtc	aggagtTTaa	gacaagcctg	gccaacatgg	tgaagcgccg	31920
tctctactaa	aaatacaaaa	attagccggg	tatgatggcg	catgcctgta	atcccagcta	31980
ctccagaggc	tgaggcatga	gaatcacttg	aactcaggag	atggagggtg	cagtgaagctg	32040
agatgggtgcc	actgcactct	agcctgggca	acagagttag	attctgtctc	aaacaacaac	32100
aacaacaata	acaaaacatc	tcttttcagg	ccaggtagctg	tggctcacgc	ctgtaatccc	32160
agcacttttg	gaggccaaaa	caggagggtc	gcttgagacc	aggagtTTga	gaccagcttg	32220
ggcagctggg	ctctatttga	acaaacaaac	aaacaaacac	aatactcttt	tcatagaaaa	32280
atggtttacta	cacaataaac	tttaaaagaa	tatgcagctg	tattaatgct	atgactccaa	32340
tgtaaaaaaa	aaaaaatata	tatatatata	tacacacaca	caaacacatt	ctgaaataga	32400
tttaaaggaa	ttacatcaac	atgtcaattt	ttattttttc	ggagacaggg	tctcgctgtg	32460
tcaccaagac	tggagtacag	tgggtcaatc	acagctcact	gcagccttga	cttcctggcc	32520
tcaagtgtac	ctccccctc	agcctcccaa	agtgtggggg	tcacagacca	ccacacctgg	32580
caacatgtca	gtttttgttc	tgcatagtgg	gatgggtggg	tatggatggt	tttatctttt	32640
atTTTctttt	ttatatTTTT	ctaaatTTTT	cacattgaac	attattttat	aatctttcaa	32700
acatatctct	taaaaggact	ggttcctata	gaattcagtg	caagaaatct	tctgtgtttc	32760
tttatacttt	ggttgccttg	atcactgggc	ctttcctgac	agcaaagaag	aggtttagtg	32820
aggcagcaga	taaaacacag	gtatgtctca	tttaaaatgc	atgtatttat	aataaaaagta	32880
taggtggtac	ccaaaggaaa	atgtcatgac	acattgcaaa	gtggaacaga	agttatcttt	32940
agatcacttt	ctgttctgga	ttattgtatg	agcctgattt	tcgtctctct	ttccgccttc	33000
cctcaccttc	gttgtaaatc	cactagtga	tggatgtgaa	gtacaagtct	taactttaaa	33060
aagttttatg	aagctgtgta	gtaaatccct	tttgtaaagt	gtcttgactg	cgtttctcaa	33120
tatatctttt	ggtttcatta	gattcaagta	tataaatgag	aactgtaaat	ttggacagac	33180
tttttcagtc	atctttacgg	taataagttc	ccaattagac	aatagttatt	tgttttatga	33240
cttgctgttg	gtagggttatc	cccaagggac	tgagaaatc	ctgttttgaa	aaagtccaaa	33300
agtctttgat	gacttgctgt	ttcatttttt	tcttttctct	tcagttatag	aaaacaggat	33360
tacacccacc	ttgcctttgt	acagtgcac	tactatctgc	tgacttaacc	tgagtaaatg	33420
ctttgaattg	agccccatat	aatgtcctaa	ggcagcctat	atggagtaat	gaattgtctt	33480
ctctcttatg	caccagagtg	ggtagttggc	actcaagttg	ttcctcagat	aactttgtgt	33540
gttctggggc	tcaattgaag	agttattaag	tcacaggctt	ggggagaaca	ttcatcctat	33600
ggcattgaat	gaagtgttgc	ccaattctag	aatgtcta	aaaatttttt	taaaaaccca	33660
caggcttaga	attattccgt	agatatgaag	taatgtagtt	agaacttagt	ggagttcttt	33720
agattaactt	gtaatttgaa	aaacccaaat	tgaaattgtg	aaataacatg	ggctctttga	33780
ggctcttttc	agtaaaaacag	ttacagtaaa	gctgcttggc	agtgattttc	ctagacactt	33840
tggctagtca	tctcctgtga	ctgctgttaa	ttaaatatgg	tttgtagcta	agcagcctgt	33900
aaggagaaga	ctatggaagt	atttgcatat	tctctccttg	aaaatactac	ctggtctttg	33960
gctttaagtt	atacttttat	tttcccctgt	agaataacta	ttaaagtatt	acctatgggtg	34020
attagactaa	gaagtaaaac	atgaaatcag	tcattgtttg	tgccctgggtg	ccttcttttt	34080
tttttttttg	agacagagtc	tcactctgtt	gcccaggctg	gagtgcattg	gcacgatctt	34140
ggctcactgc	aacctctgcc	tcccagggtc	aagcgattct	cctgcctcag	cctcccaagt	34200
agctgagact	acaggcgccc	accaccacgc	ctggctaatt	tttgaatttt	tagtagagac	34260
aggggtttcac	tatatgggtc	aggctgggtc	caaactcctg	accttgatg	ccgcccacct	34320
cagcctccca	aagtgtctgg	attatagggtg	ttagccactg	tgcccagcct	ggtgctttta	34380
ttttattggaa	aaaactacta	gctgggtttc	gttttaagaa	ataacacagg	ccgggtgcca	34440
tgacttgctg	ttgtactccc	agcagtttgg	gaggccgagg	cgggcggatc	acgaggtcag	34500
gagtttgaga	ccagcctggc	caacatagtg	aaaccccgctc	tctactaaaa	atacaaaaat	34560
tagccggggcg	tgggtggggca	tgccgttagt	cccagctact	cgggaggctg	aggcaggaga	34620
atcgcttgaa	cctgggaggt	ggaggctgca	gtgagccaa	atcgccccac	tgacacaccag	34680
cccggttgac	agtatttcat	ctcaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaagaacaca	attattgtac	34740
tacttactag	ccctcctctg	tcccagcta	aaaaataagaa	cagcaacaac	caaaaaaatcc	34800
ttagttatgt	actggaaatg	aattagataa	ttttcaataa	cttacacggt	tttaggatat	34860
gttagtttga	aaatgcaaat	attcatgcat	gaccccgctg	ttaatctatg	atggagcagg	34920
tatagtgagg	tgtgttttca	tgatttaatt	tggaccttca	gggagtagac	tgtgatgcct	34980
ctgcatttgt	atccaagaca	aataattaaa	tagtctat	ttggctgggc	atgatgcctc	35040
atgcctgcag	tcccagcact	ttgggaggct	gaggtgggag	gatcgcttga	ggccaggagt	35100

tcaagatcag	tctgggcaac	aaaatgagac	cttgtctcta	caaaaactac	aaaaaattag	35160
ctgaacattg	tggcttgtgc	ccctagtccc	agctactcag	gtccctgagt	taggaggatt	35220
gcttgagccc	aggagttgga	ggttacagtg	atctatattt	gccactgcac	tccagcctgg	35280
gtgacagaga	gagaccctgt	ctcaaaaaat	aaagtctgtt	tttaaaatta	attttaaaca	35340
ctggagttta	ttacaaaaag	cagttgggtc	ttttttttaa	tcattttttt	ttaggagAAC	35400
caccgctttt	tggctacatt	gtctagagta	gcagtgttca	ataaaaaata	gatccaagtc	35460
acatatgtaa	tgtaagttt	tcttttagtt	tctttttctt	ttcttttctt	ttcttttctt	35520
tctttctttc	tttctttttt	ttttttttga	tatgcagtct	cactctgttg	cccaggctgg	35580
agtgcagtgg	cacgatctcg	gcccactgca	acctccgct	cccgggttca	agcaattctc	35640
ctgcctcagc	ctcccagta	gctgggacta	caggcatgtg	ccaccatacc	cagctaattt	35700
ttgtattttt	agtagagatg	gagctttgcc	atgttggtcca	gtctggtctc	aaactcctga	35760
cctcgggtga	tccacatgct	ttggcctccc	taagtgtctg	gattacaggg	atgagccacc	35820
atgccttacc	aatgttaagt	ttcttagtag	ccatatataa	agaagtataa	agaaatgggt	35880
gaagttaatt	ttaataatat	attttattta	acccaatata	tctaaaaat	tatcattttca	35940
acatgaacaa	gatactttac	attcttttgt	ttttcactaa	gtcctcaaaa	tccagtgtgt	36000
attttatatt	gacagcatag	ttcagtttga	agcagccaca	tttcaagtgc	tcagtagcca	36060
catgtggcta	gtgactccat	actggactgt	gtaggtttag	agtttcagta	aattttgatg	36120
caatagaatc	tacataaatt	ggcatattat	gcagatttct	ttgtatgcac	atcagttctt	36180
gcatagcata	agtcaggcca	tgatgctttt	agctatgag	gcagattttt	tttttttttt	36240
ttttgagaca	gagtcctcact	tggtcaccga	ggctggagt	tagatgcaca	atcttggtct	36300
actgcaacct	ccatgtgagg	cagattttta	cttggtccct	atgcaaatat	tgtaagagag	36360
atctaattgg	ctttgatttc	ttacagagg	caatcaatac	atgccatggt	tacaatgctt	36420
cagcatatag	tatgcacgtc	agccactgct	tttactctgg	ctagtgttta	gtgtacctgt	36480
accactgcc	aggcagcatt	tgctctgtgg	caggtgaatc	ttagggtgga	aggtggcaag	36540
taacattgct	tttttttgag	agggagtctt	gctgtattgc	ccaggctgga	gtgcagtggg	36600
gcatctcgg	ctcactacaa	cctccacctc	ccgggttcaa	gtgattctcc	tgctcagccc	36660
tcctgagtag	ctgggtattac	agacggccac	caccatgctc	ggctaatttt	tgtattttta	36720
gtagagacgg	ggtttcacta	tggtggccag	gctggtctcg	aactcctgac	ctcgtgatcc	36780
accgcctcg	gcctcccaaa	gttctgggat	tacaggtgtg	agccaccgtg	cccagcctac	36840
atttttaaat	taattaatta	taagcaggat	ctcactgtgt	tggccagact	ggtcttgaa	36900
tgataagagt	tcaagaccag	cctaggcaac	atggtaaaac	cctgtctact	aaaaaatata	36960
aaaaaaaaaa	ttagctgggc	atggtgtgtc	gtgcctataa	tcccagctac	ttgggaggct	37020
gaggcaggaa	aatcgcttga	acccgggaga	ctgaagtgtc	agtgaagtga	gattgcacca	37080
ctgcactcca	gcctaggcga	ttccatctca	aaaacaataa	caacaaaata	acattgttgg	37140
aatatttagt	taattttatag	aagcgtattg	gcctaattgg	ggcaaatacc	ttattctgac	37200
attctctcta	tttgctttac	tgagcttttt	caccagtggg	atttaagccc	ttgatacatg	37260
aggagggaaa	ataccttgga	gctgtgctgc	acatgtaaa	tacacaggag	atttagaaaa	37320
cttcgtagca	aaaaaaagag	tgtaaagtat	ctcattaata	gtttttgtgg	gctggacacg	37380
gtggctcaag	cctatactct	tggtcacattg	ggaggctgag	atgcatgagt	ctaggagtgt	37440
gagaccagcc	agtaggaccc	cgtctctaca	aaaataatca	aaaataatca	gccagatgtg	37500
gtgcgcactc	gtagtcccag	ttacttgaga	ggctgaggtg	ggaggatcgt	ttgagctggg	37560
aagttgaggc	tacagtgagc	tgtgattgaa	ccactgcact	ccagcctggg	tgacagagtg	37620
cctgtctcca	aaaaataaat	aaataataaa	taatatgttt	tgtatgttca	tatgttgcaa	37680
taacattttg	gatataattaa	atgaataaaa	atacatttaa	attaatttca	cctgtttctt	37740
ttcttttctt	tttttttttt	tttttttgaga	tggagtctcg	ctatgtcctc	aggctggagt	37800
gcagtggcac	gatctcggct	cactgcaacc	tcctcctcct	gggttcaagc	gattcttctg	37860
cctcagcctc	cctagtagct	gggattaaag	gcatgtgcca	ccaccccag	ctaatttttg	37920
tatttttagt	agagacgggg	tttcaccata	ttggccagga	tggtctcgat	ctcctgacct	37980
catgatccgc	ctgccttggc	ctcccaaagt	tctgggatta	caggcgtgag	ccactgcacc	38040
cagcctcttt	taacttttta	agtattggcta	ccagaaaatt	taaaatgcat	gtgtggcctg	38100
tattctattt	ctggttgatg	ctgctgcctt	agattattaa	ttattcaatg	taaagactgc	38160
tgggaggtac	tacctgcact	tcctgaata	tatgcttgag	agctccacca	gccgtcttca	38220
cagtagcaag	aggggtattc	tgagtctgtc	ccccaaagag	ggaggggagaa	gtgcagccct	38280
ctcaggttct	gtcagaaaac	ctgatcccag	gccaggcgtg	gtagcttacg	cctgtaatcc	38340
cagcactttg	ggagggttgg	gcaggaggat	tgcttaagcc	caggagttcg	agaccagcct	38400
gggcaacaca	gtgaagaccc	tatctctaca	aaaatttttt	taaaaaaatt	agccagggtc	38460
agcaatgctg	cctgtactcc	cagctgcttg	ggaggctgag	gtaggaggat	tgcttgagcc	38520
caggagttag	aggttgcaag	agtttagagg	tccacgatcg	cacctttcat	tccgttacat	38580
ttgctgcctt	gagaacagaa	gacctgctgg	ttttgttgcc	agtttgctca	gtcattttta	38640
tgaaaagacc	agtgcttaact	aggtgcttct	ctgtgccttc	tctgagaatc	aagaactcta	38700
gtatgtttgc	gtgtgttcag	tctctatta	aatgttctca	ctatcccaga	gaaccatctc	38760
attggacctt	ggctctgaca	taccttcata	tttggtctct	acttgtaatt	atttttagaa	38820
cttctctttt	tttttttttg	gagacagagt	tttgctctag	ttgccagact	ggaatgcagt	38880
ggcacgatct	cagctcacct	caacctctgc	cttccagggt	caagcaatcc	tcctgcctca	38940
acctcttgag	tagctgtaat	tacaggcatg	tgccaccaag	cctggctaat	tttgtgtttt	39000

tagtagagac	aggggtttctc	caagttgggtc	aggctgggtct	caaactcccc	acctcaggtg	39060
atctgccccg	cttggcctcc	caaagtgtctg	ggattacagg	cgttaagccac	tgcgcctggc	39120
ctaatttttag	aacttggttaa	aacaacttgg	cctctattga	tatttccatg	acccatgcta	39180
ttcagaaaga	ggattacagg	taattagctg	gctgggtttc	tcataccaga	gcatttcact	39240
gggatgttcc	tgaacctggg	acaactttta	tgcctggcat	ttttctttcc	ttctctgttg	39300
tcccagacta	agcaattttt	aaaatagtta	ttatttgttg	agtaggagaa	tctcaggcag	39360
atcttcctgg	atcctcattt	atacttttaa	acctgtagtc	ttggaattag	tgtctgtccc	39420
cccaacccca	aacatccaat	ttctacattt	tggctacagt	acaggtttac	tgtgtataac	39480
taaaagggct	gtggaggaga	aagaaaggaa	ccgacatttg	ttgggcatct	gttatgtgcc	39540
atgcactgag	ctggatgctg	taggaatato	tcaatacctc	tgaggagtgg	gaattattat	39600
ctctattttta	tagacaaggg	aatagaaatc	tgggagttaa	gtaatttttt	aatttcacac	39660
acttctggta	gataatggat	tctagaacct	ggcataatag	ccacttgtca	tcccagtgtg	39720
aaagagatgt	gtggccagat	gggggtggctc	acatatgtaa	tcccagcact	ttgggaagcc	39780
gaggcaggag	gatgacttga	gcccaggagt	tcaagaccag	cctgggcatg	ttttgtttgt	39840
ctcacgaaac	atttttttaa	aatgagtggt	ggcatgggtg	tgtgtgccta	tagtcccagc	39900
tcctcgggag	gctgaggtgg	gaggatctct	tgagcccatg	atcatgccat	tgcactctag	39960
cctggggccac	agagcaagac	tctgtcttca	aaaaataata	aaaaggagct	gtgattatcc	40020
caaggtgggg	attgtgaatg	tgtttgtatt	gttctaaact	gggagaaaca	ggctgggtgt	40080
gttggcttat	gcctgtaatc	tcagcacttt	gggaggccaa	ggtgggagga	tcacttgagt	40140
ccaggagttc	aaggccaccc	tgggcaacag	gcaaaaaata	gagaccccat	ctctattttt	40200
taaaaataaaa	ataaactggg	agaaagaagc	agggtcctcc	ccagagcatc	tttatcccta	40260
gtcacagacc	tgacacctgt	gttgggcaat	ggctacttct	agattgttta	cccactactg	40320
gacttgtggt	gaacatatgc	acactttggt	ttacagttgg	gacccctgat	tttagcagga	40380
tggcccaatg	gaatcagcta	cagcagcttg	acacacggta	cctggagcag	ctccatcagc	40440
tctacagtga	cagcttccca	atggagctgc	ggcagtttct	ggcccttggt	attgagagtc	40500
aagattggta	agtccttctt	aagtgactct	ccaaattggt	aggtttcagt	ttgagtcaag	40560
agacatgaac	tcttaatgtc	atgccttgct	gttccattaa	aaaatgtatg	ggtacaggtg	40620
atggggaaaa	tgagatcagg	agataaagg	gcaccctttg	gtcttgtaaa	gcctttttta	40680
tcttagaagg	gcatgtgggc	aactgtcttt	gacacattga	aaccgcctgt	atggtgggtg	40740
atgtcttgaa	ggttgatttg	gacctcattt	acttgggcag	atcctctata	tattctgata	40800
atccagtgat	gtggtagaca	tattttttct	ctgaatgtga	attctgtcat	agctagaact	40860
ttgggttgat	acttghtaatt	ccccttagt	taaaggaagg	agccacagg	gtgtattagt	40920
ctgtctctcaa	tttgcataaa	agaaataacct	gagactgggt	aattttataag	aaaagaggtt	40980
taatcggtc	atagttctgc	aggctatata	ggaagcatag	cagcatctgc	tgtcggggag	41040
gcctcagcaa	gcttccaatc	atggcggaag	gcagagaggg	agcaggcagg	tcacatggcc	41100
acagcaagag	caagagagca	agggggagg	gccacacact	tttaaaactat	cagatctcac	41160
aagaactcac	tgtctcgagg	acagtatcaa	cagggatgg	attaaacat	tcatgagaaa	41220
cccaccccca	tgatccagtc	accttccacc	aggcccccacc	tcaaacagtg	ggggttacat	41280
ttcagtatga	gatttgggca	gggatgtaga	tccaaactag	atcacaggat	aagggaagta	41340
gattccattc	atagagcaga	taatggcaca	gatgtccagc	aactattttc	ttcactttta	41400
tatgctcagg	ctcactactg	attttggttt	aattcaggcc	agtgttaata	tgacctgggt	41460
tttccagaat	gcatactctg	atttggtgaa	gggcccagg	gtgattcaca	gatgttggag	41520
ataggccatc	ccagcctggg	attacttatt	tgtactaata	aacttgacca	gagtttaattg	41580
aggggtttaa	gcaaaacagc	atatctgtct	actttgtctc	aatattttac	aaatacaaca	41640
gattatgaga	gtgggtaata	atatctggaa	taattgtttt	tttgttttgt	ggtttttttt	41700
tttttttttt	tgagatggag	tctggctgta	gcccaggctg	gagtgcagtg	gtacagctctc	41760
ggctcactgc	acctctgcct	cttggttca	agcgattctc	ccgcctcagc	ctcccagta	41820
gctgggatta	caggtgccca	ccaccacacc	tggctaattt	tttattttta	gtagagacag	41880
cgtttcacca	tgttggccag	gttggctctg	aactcctgac	ctcaggtgat	ccgcctgcct	41940
cagcctccca	aagtgtctgg	attacaggca	tgagccacca	tgcctggcct	ggaataattg	42000
ttaataatta	ttacattgat	ggcattttat	tgtgtagcaa	gaagaatcta	acatgatgaa	42060
tgggttatag	catcaggttt	gctttgtttt	ttgttttttt	tcctctttct	tgatgggtgat	42120
ttctgtgttt	gtgtgtatgc	gtcggttca	gagccattct	ttatcattct	tccttttctt	42180
agggcatatg	cggccagcaa	agaatcacat	gccacttttg	tgtttcataa	tctcctggga	42240
gagattgacc	agcagtatag	ccgcttctct	caagagtcga	atgttctcta	tcagcacaa	42300
ctacgaagaa	tcaagcagtt	tcttcaggta	tgatgagaaa	ctgaggacaa	ggagaaacag	42360
gacccgcaga	gtcgggtgtt	agtgttcttt	cctggaagca	tctcttttct	catttggcta	42420
agtaaccgaga	tattctcttg	tatttcaaat	cacaggagaa	gtaattagcc	ctttctcaaa	42480
gctctgtata	cttaccctgt	agcatcatta	cctgagaatc	acttctcttg	tcacagttga	42540
agtaataaag	tgattgttat	gttaatcata	catgttagca	tgtaaacgcg	gtccactgat	42600
aggaagatga	ctctcactgt	tacatgttaa	atgtttgacc	ataatgggat	acttcttgac	42660
taagtcatga	gcttccctgc	aagaccagga	tagtatactg	tgtaaagact	cagacaaggc	42720
caggcatggg	ggctcacgcc	tgtaatccca	acaccttagg	agggttaggt	gggaggattg	42780
cttgagcctg	ggagttttga	gaccagcttg	ggcaacataa	caagacacca	tctctacaga	42840
aatttttttt	aaaaactagc	tgattgtggt	ggcatgcacc	tgtagtccca	gctactcaga	42900

aggctgaggt gagaaaattg tttgagcctg ggaggtcgaa gctgcaataa gccgtgattg 42960
 cgccactgca ctccagcctg gcggacagag tgagagccag tctcaaaaaa aaaaaaaa 43020
 gactcaggct aatgtgcctt ctgttacaga aatagtaacg acctccctt cgcccccg 43080
 cgacagagag ccttcaccca ggctctgaag cctttgttcc gttgtttcct agaataaatg 43140
 ctttccttga tgaatacatt agttttaagg tgccacagtt cagtcacat ctccatggtc 43200
 tgctgctgat ttttattctc tttctctcct acttatagag caggtatctt gagaagccaa 43260
 tggagattgc ccggtattg gcgcggtgcc tgtgggaaga atcacgcctt ctacagactg 43320
 cagccactgc ggcccagggt agacctgaga caaaacaaat ccctggtctg ggaggaaatg 43380
 aaaatcaaac aactttataa tgagataaat tattagatct actaaaaaag aaggaaaaga 43440
 aattaaatag atcaataatc ataaaaatc attgaaaaac tctaaaaaaa aagaaagttc 43500
 cccccccaa aatacattga aaaactctaa aaaaaagaaa gttccaccaa aagaatccaa 43560
 cagacccaat ggtttaaaag ttttgttttg tcttgacaaa ttttctttgt ttttcttttt 43620
 ttttttttct gagacagagt tttgctcttg ttaccaggtc tagagtcaa tggcgcgctc 43680
 ttggctcact gcaacctcca cctccagggt tcaagtatt ctctgcctc agcctcaaga 43740
 gtagctggga ttataggcgt gtgccaccac acccagctaa ttttgtattt ttagtagaga 43800
 cggggtttct tcatgttggt caggttggtc tgaactcct gacctcaggt gatccgccc 43860
 cctcagcctc ccacagtgct gggattacag gcgtgagcca ctgtgcccg cctgttctga 43920
 caaactttca tagtacgat tattccaata tcttcaaac ttttccaaag tataggaaaa 43980
 caaggatgt tttcagctta ttttatgagg ctggaaaaat cctcatatca aaacctaaaa 44040
 aacagccagg tgtagtagct cacgcctgta atcccagcac tttgggaggc tgagacgggc 44100
 agattgcctg agcctcagga gtctgagacc agctggggca atgtagcgag acctcatctc 44160
 tctttttttt tttttttgag acagagtctc tctctgtcgt ccaggctgga gtgcagtggg 44220
 gccatcttag ctcaactgca cctccgcctc ccaggttcaa gcgattctct tgcctcagcc 44280
 tcccgaactag ctgggactac aggtgtgtgc caccaagcct ggctaatttt ttgtattttt 44340
 ttttagtagag atgggggttc acctgtttag gcaggatggt cttgatctcc tgacttcatg 44400
 atccaccggc cacagcctcc caaagtgtg ggattatagg catgagccac cacgcccagc 44460
 cttttttttt tttttttgag agagtcttc tctgttgcca ggctggagtg cagtggcgtg 44520
 atctcagctc actgcaactt ctgcctccca ggttcaagct attcccctgc ctcagcctcc 44580
 caagtagctg ggactacagg cgcgcgccac cacaccagc taattttttg tgtttttagt 44640
 agagatgggg tttcactgtg ttagccagga tgggtctgat ctcttgacct cgtgatccgc 44700
 ccgctcggc ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgag caaccgcacc tggcttaatt 44760
 aaggtatctt ttttaacaaa gaaagaatat tttatcagaa ccaaaggag catgatgcac 44820
 agtgggtaaa cactattctc agtaaaaaa gcaaaagata aggatgtctt ttaccattga 44880
 tacttttctg agggatccag cctatgcaaa aagaaaaaga aatgagggta caaatattgg 44940
 aaagcaaggg acagaactct tattattttac agatagatag gtcttcctcg aagatccaag 45000
 agaaacaaaa ctaacaataa caattggaac tagcaagggt tagaaaaggc attgtatata 45060
 agataaatat ttttagaatc tgcagttccc ttaatcagta gcagcagtaa cctgttagaa 45120
 gatgtaatga aagtaaatg ctgggcccagg cacgatgtct cagcctgta atccaagcac 45180
 tttgggaggc caaggtgggc agatcatgag gtcaagagat tgagaccatc ctggccaaca 45240
 tgatgaacc ccatctctac taaaaatata aaaattagct ggggtgtgtg gtacgcgcct 45300
 gtagtcccag ctactcggga agctggggca ggagaatcgc ttgaacctgg gaggcggagg 45360
 ttgtattgaa ccaagattgc gccactgcac tctggggcga cagagcgaga ctccgactga 45420
 aaaaaaaaaa aaaaaaaa gaaagatctg attcatagta gtaaaactaa atgtatgcaa 45480
 tttgcatata ctattggtat gtatgggaaa atatctggaa acacatatat taaatcatta 45540
 aagtagtcgg tcataggaga cttttttact ttctgtgagg ggttttaccg tctttaatat 45600
 cctataatca gggacatttt ttctttttct cctgacccc ctgcttttta aaaaattgtg 45660
 gtgaaatata cataacatta catttcaaat ttaccttgt aacctttgtt tttttttttt 45720
 ttttttgaga cagtctcact ctgtcaccca ggctggagtg cagtgggtg atcacagctc 45780
 actgcagcct caaccacctg ggccttagcg atcctcctgc ctacgcctta tgagtactg 45840
 ggactacagg cacatgccac catgccagc taattttttt tttttttttt ttggtagag 45900
 atgggctctt gccatgtaa ccaggctggt ttggaactc tgggctcatc aactgatagc 45960
 aaagagctct ccagcgagaa agaatcatc gttcaagac agaaacagaa atgtgtattc 46020
 ttgggagaag ttagaaaagt tcagcatctg attgggtcgg ggaagacaag ctagtcaagg 46080
 ccacatgatg ttttaattag tcatgcctaa cagtggggcc ctggaagagc agtttaccac 46140
 aaggggcaaa ctgcttcggt ttgaaccgc agccctgcca cttgctctgt aaccttaagt 46200
 aaacaatttt tactctctct gtctctccaa tgggagtgt aacaatacct tcttcataga 46260
 attaatctat acatgtaaaa tgcttagaac agtatctgac acataaatgc aaaataattt 46320
 aactgctttc tgtgtgtgt gacatcact tcatcaccct caccattact gtaggaaatg 46380
 gggaccaggt gaagaatttt ttttttttct tttgagacag agtctcactc tgtcaccag 46440
 gccggagtgc agtgacgcga tttcgccca ctgcaacctc tgcctctcag gttcaagcga 46500
 ttctcatgtc tcagcttccc aagtagctgg gattacaggg atgagccacc aactgggct 46560
 atttttttgt attttttagt agataggggt tcaccatatt ggccaggctg gtctcaaat 46620
 cctgacctca ggtgatccat ccacctcgcc gctgggatta caggcataag 46680
 ccactgtgtc cgccctagt gaggaatttt aagcagaaaa ctgatatgct cagggtgtgag 46740
 cgaggtggta ggttaacact actgtgcagt gccctgtagc ccaagaggtt agcacacag 46800

catttgctca ggcagcacta ggattttctg ctgtggaaaa cctttgtatt ttatcctgct 46860
ccacaagata aaaataagtg gtttaagtca atttgatag aggcctcaac ttaccatggg 46920
aggtaggaaa gccaaagtta tcccaaggat gttttcaatc gtacggatta ggggtctgca 46980
aactgtgagc gtggcccaaa tccagcctgc tgcttgtttt tgtaaatgag gttttttcgg 47040
aaccagcca cactcattta tttatgcatt atctgtggct gctttggtgc tgcagtggca 47100
gggctatttg tggcagggac tgtatgacct aggaaccaa aaatatttac cctctgtccc 47160
ttagagaaaa agtttgcaac ccctgatata aagctataag ttggttattt gtggcctcaa 47220
cccaggcctc actgctattt tttctgttta caatacctgg catgctctta agtgtctaga 47280
attggttaaa gatagaagag tggatgtaat ccctgctacc aagggtctgc aggcagttg 47340
ggattataag tacacaaaca ctcaaagtga gaaaaacaca gaaaaggatg tgtgtcattt 47400
tgtctaagga agttgaataa gatttctcag gaaaagaaac atttgaactg aatttgaagg 47460
tgagtgaagt cagggtgtgt tgggctgaag ccagggccat gctgagtggg tagcgggtgg 47520
gaagagagtg tggaaacaca ctgcatgcag ggaagagttg ggagctctgg gtgaccaagg 47580
cacaggggag gaaagtga gttatcaatt gtgtgaaaca gctttctgtg ttggcctgag 47640
atgtttatag ctggaagcag tggggagcca atacagtttt ttacgaaggt attagaggtg 47700
ggtttctgtg ggtgatcgtt aatcatgttt tctcccttta agttagtcc tgcttgagaa 47760
atagacatga gaaaggaatg aaggttaaaa catcagctgt attgttggtg aaactagaat 47820
ggaaagtgtg gcttgagctg gtaaccatag gggctttcca atgcctgtgc cctgagttag 47880
atcttggggg agagagactg gatgtgcaga gcagcaccac caccacccc cagccatcca 47940
tatggagctt cagctgccat agaccaacaa ggcagaggga taggcctcta gacctgcttc 48000
tagaaaccag gctgctgctc ttgcttatgg tgggcccctag gaaggcaaga gtgagaggag 48060
ggaggcacca gcttaggtgc tgggttcttt gaagatctgt gtgtacacag agtctttctc 48120
tccatcttac caatcagatg agtcaactgc actgtgggaa gaagtgggg catgggtcac 48180
cttcccaaaa cttctaagaa gtttgtattc tgtgggcttg gatagggacc atgggaaagg 48240
aagagaatgg ttgccataa aactggctgt agtgtggcct caaactctct gacttaaatg 48300
atcctcccac ctgagcctcc caagtagcta gaactacagg tatatgccac catgcccagc 48360
tagttaaaaa aaaatttttt tttttttttg gttgagatga ggtctctttc tatgttccct 48420
gggcccgtct caaactccca gctcaagtgc atcctcctgc ctgggtttcc caaagtgcta 48480
ggattatagg tgggagctac catgcctagc ccaagcctgt aatttttttt tttttttttt 48540
gagatggagt ttcaactttt ttgctcaggc tggagtgcac ggcgcagctc tggctcacca 48600
caacctccac ctcccgggtt caggcgattc tcttctctca gcctcccag tagctgggat 48660
tacaggcatg caccaccaag ctcaagtaac tttgtatttt tagtagagat gggtttctcc 48720
gtgtcggta ggtcgtctc aaactcctga cctcaggtta tctgcccacc ttggcctccc 48780
aaagtgtgg gattacaggc atcagccacc gcacctggca cgaacctgta atttttaagt 48840
ttcatatgct atttattttt tgttatttct ttaattcatt cattcattta ttcattcgag 48900
atggggcctc actatgttga ctaggctagt tttgaactcc tggcctcaag cagtcctccc 48960
acttcagcct tcccaagtgc tgatattata ggtgtgagct gctacatcca gcttctcttc 49020
ttctttttct ttttccatgt gctatttgac attttccaag gtaccagcct ccccttctcc 49080
ccaagataat atcttttaat atggaatttc atccctaggg caggactttt tttttattat 49140
ccctcagaaa tatactggac accacgttta agtagacatc caacatctgc tgtcataaat 49200
tgttttgaat tttttgacat acttgcccat gaggtttttg aaggcataga ccatgtctta 49260
gctgaacatg tggctcttta gtgccataa ggggggttat ggtatgacct gtgtagtgc 49320
acctgtgtag tgacagacc tctgcctctg tttccctcc tcttgtgatg gcagcagct 49380
ctcaagccaa acaagaagg tagttagggt gggatggaag ctgggtagag gtattcctct 49440
ccccatagtt ctgtgttcac atgtgcattg acctcctttt tggcagcaag ggggccaggc 49500
caaccacccc acagcagccg tggtgacgga gaagcagcag atgctggagc agcacctca 49560
ggatgtccgg aagagagtg aggtgatgca agttacaagc ctggggcagg gagctttcat 49620
taattttttt tttttttttt gagacagggt cttgctctgc cactcaggct gggctgcagt 49680
ggcatgatca cagctcactg cagcctcgac ctctcaggcc caagcgatcc tctacctca 49740
tcctcccaag tagccgggac cacaggcatg caccaccacg ccagctaatt taaaaaaaaa 49800
aaatttgtag agatgggggt ctcctgtgtg tgctcaggct gatcatgaac tccctgggctc 49860
aagtatcct cccaactcag cctctcaaag tgtcggcatt acaggcgtga gccactgcac 49920
ctggccaaca gggagccttc tottggggat actgcctgca ggtcctgcat gtatcttttt 49980
tgaggttttg gcttcatttg aattctcctc agaaacttta tttttctgt tcccaaggaa 50040
atctttcttt acttctgttt ttttgtttgc ttatttttaa caggatctag aacagaaaat 50100
gaaagtggta gagaatctcc aggatgactt tgatttcaac tataaaacc tcaagagtca 50160
aggaggcaag tgaattattg agatgtttaa atctctagaa agtgagtttg tgttgttgag 50220
ttgaaagact catttgtctt aactctgttt agatcttaag gcggggcggg cgcaaggagg 50280
gtacgggtcc tcaaaggagc ctggctatta aggacaggag tattccctca ggtccaggag 50340
tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag 50400
tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag 50460
tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag 50520
tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag 50580
tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag 50640
tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag tattccctca ggtccaggag 50700

tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	50760
tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	50820
tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	50880
tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	50940
tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	tattccctca	ggccaaggag	51000
tattccctca	ggccaaggag	ttttttcttc	cttcgcagac	atgcaagatc	tgaatggaaa	51060
caaccagtca	gtgaccaggc	agaagatgca	gcagctggaa	cagatgctca	ctgcgctgga	51120
ccagatgcgg	agagtaaggg	cataggtcgg	accacttccc	ccatgtgtct	cgctcacttg	51180
cggtatttca	gcgtcttggt	gcagaacttg	cttggtttct	aagaagttcc	tgctctggag	51240
ttgactaaag	aatgtgggta	gagacagtct	gaggaaatgt	tttctgactt	tggtttgggt	51300
tccaaccaga	gcatcgtgag	tgagctggcg	gggtttttgt	cagcgatgga	gtacgtgcag	51360
aaaactctca	cggacgagga	gctggctgac	tggaagaggc	ggcaacagat	tgctgtcatt	51420
ggagggccgc	ccaacatctg	cctagatcgg	ctagaaaact	ggtaaggat	gaaagaagct	51480
tttcccttct	ttctcgaaaag	ctcagattgaa	ttctgatctt	aactgcaggc	ccacagaatt	51540
gggtactatat	ctccaacgtg	gggacttttc	catattcaaa	tttagcccaa	gaattaaagt	51600
ttttacttta	tttcggccag	gcgtctgtgc	tcacacctgt	aatcccagca	ctttgggaga	51660
ccaagatggg	cggatcactt	gaggtcagga	gtttgagacc	agcctggcca	acatggtgaa	51720
aacacatctc	tactaaaaac	ataaaaaaat	tagccggggc	tggtggtgct	cacctgtagt	51780
cccagctact	ctggggcggt	gaggcaggag	aatcacttga	acctgggata	tggaagtgtc	51840
agtgagcgga	gatcttacta	ccgcacacca	accagcctgg	gagacagagt	gagactccat	51900
ctcaaaaaaa	taaaaataaa	ataaagtttt	tactttatct	ggagaaactt	tgttttaaaa	51960
aatgtattta	tattattata	ttttaagtat	attttactta	ataattcaat	taaggctttt	52020
ggtttaactg	tatttaacag	atagacaaac	cttttaattt	tagttatttt	agtaatactaa	52080
aatgacacat	gcccttttta	agggaaaaaa	ttcaaataca	gaaaattaat	caagagaaga	52140
aaaaattttt	aaatgaaatc	atcagcagta	ctagtattta	aaatttagtt	gatgctcaat	52200
ctagacatct	gtcattatgt	atatacacat	tatgtatata	cacataaaga	tagaaattta	52260
tacagtttat	attaggatca	tttttttttc	tttttttgga	gtcagggctc	cactgtgtta	52320
cccagctctag	agtacagtta	tgacgtcatg	gctcactgga	gccttgacct	cctgggctca	52380
ggcagctctc	ccaccttagc	cttctcagta	gctgggacta	caggcatgca	ccaccacacc	52440
tggtctaatt	ttaaattttt	tatagagaca	gggtcttact	ttgttgctct	ggctggctct	52500
aaattcctgg	gtcgaaggga	tcattcccact	tcggcctctc	aaaagctctg	gaattataga	52560
tgtgagctgc	cgtgcccagc	ccaggatctt	cctttatatg	cttttctgta	atttgcactt	52620
ttaccttcat	ccagcatatc	ttactgcaac	ccttctctgt	caaggcccta	tagtgagcat	52680
gttgaccacag	cttgcccttag	gagaaacttg	agatacacag	cctgcactgg	aaatttagcg	52740
caactctaca	tgagaatgcc	tgtctattca	tatcctcact	aaccctgagt	gttggttaatt	52800
tactgaaagc	agttttaaat	gcttcttgac	cagggaacga	agaagcttaa	gttctgggaa	52860
tggtgagata	gaagtgccag	aaaagagctc	aggagttcag	aaatccctgc	agcgggtccc	52920
ctccctctcc	tttcactttc	tgtctttctg	gtcttttggg	ctttgttaca	ctagtataaa	52980
accatcaaa	aatgatggaa	tgatgctaac	ttctctcttt	ttttaatttt	tttgagacag	53040
agtctcactc	tgtcacccag	gttagagtgc	agtggcatga	tcttggttta	ctgcaacctc	53100
ctcctcccag	gttcaagcga	ttcttagtca	caaccttcca	agtagctggg	attacaggcc	53160
catgcccaga	tgcttggtca	tttttttgta	tttttagtaga	tcgacctgcc	tcggcctctc	53220
aaatttttgc	gattacaggt	gtcagccact	gcacctggcc	taatatctct	attctttggg	53280
atagatttaa	tgagcttttt	ctccctctct	attcacttat	tccttggtgca	tgttatcaat	53340
attttgaaac	ataatgtcat	gtcctttgat	cagttgaagg	ctgacattga	aaaggcttat	53400
ggggattggg	tggttggtgt	cacgcctgta	aatcccaatg	ctttgggagg	cagagtcggg	53460
aggatcactt	gaaccacagga	gtttgagacc	agcctgggca	acaaagttag	atcccatccc	53520
tacaaaaaatt	taaaaaaacta	gacatgtgcc	attacacttc	agcctgggtg	acagagttag	53580
actccatctc	aaaaaaactaa	actaaaactaa	acaggcatgg	tggtcacacac	ctatagttct	53640
agctactcag	gaagctgagg	taggaggatc	actcatgtcc	aggagttgga	ggaggcagtg	53700
agctatgatc	atgccattgc	actgcactag	gccacagagt	gggacctgt	ctcaaaaaaa	53760
aaaaaagaaa	gaaagaaaag	aaagggctca	tgtagttcaa	gcccttctct	tcatgcaagg	53820
ggatgctaag	gccccatgat	gtgaagggcc	tggtcaaagct	tgacacagata	gtgtgtgaca	53880
gagctggctc	aaacctatct	ttgggagctg	tctaactctc	ttttctgagt	ctttatgttc	53940
atagacaagt	taggatgagt	aaagtaagt	ctaaattcca	tatttcgtgt	tctgcatatc	54000
tggtctcaga	tgcttgctcat	tttccagtga	taactccatc	aatgcctcct	agtggtataa	54060
attttaatac	ttcttggtgt	cccagccccc	tcttagaaat	ttgagatttt	aggaaggagc	54120
tagtaataaa	aggtaaaaata	aattattttc	tggtcaggga	tggtggctca	cacctgtaat	54180
gccagctact	cgggaggtcg	aggcagatgg	atcacctgag	gtcaggagtt	caagaccagc	54240
ctggccaaca	agccaataac	ccatctctac	taaaaatgca	aaaattatcc	gggagtggtg	54300
gtgggtgcct	gtaatcccag	ctacttggtg	ggctgaggca	ggagaatcac	ttgaacttgg	54360
gaggcggagg	ttgcagttag	ctgagactgt	gccactgcac	tcagcctgg	gcaacagagt	54420
aagactctat	ctcaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaggcc	aggcgagtg	gcttacacct	54480
gtaatctctc	aggaggtcca	ggcaggagaa	tcacttgaac	ccgggaaatg	gaggttgtag	54540
tgagccgaga	ttgcaccact	gcactccagc	tcaaaaaata	aataaataaa	taaattattt	54600

tcttttttta	tttatttttt	cagcatccac	ccaacatggt	gaaaaattcc	tcttttctta	54660
atgtcactga	actgtaaaact	taagatgaaa	aattgtaaat	ttcatgctat	atatatttca	54720
ccacaataaaa	aaaattccctt	gttcttattg	tagtgggtctc	catgtcttca	gtatttccctt	54780
ccccttctcc	atctcacctg	tatacattca	ctttggtaaat	tagcatcttt	cttaatttat	54840
tggcaggata	acgtcattag	cagaatctca	acttcagacc	cgtcaacaaa	ttaagaaact	54900
ggaggagttg	cagcaaaaag	tttccctaaa	aggggacccc	attgtacagc	accggccgat	54960
gctggaggag	agaatcgtgg	agctgttttag	aaacttaatg	aaaaggtaat	ttagcatcct	55020
tgtccctttc	cctcatctaa	aaaataccta	aagactcacg	tggtagagtg	agaggcgggc	55080
tgacttctgg	tcatggccgt	ggcgcgtgag	cccattctct	ctttcctcag	tgcttttggtg	55140
gtggagcggc	agccctgcat	gcccattgcat	cctgaccggc	ccctcgtcat	caagaccggc	55200
gtccagttca	ctactaaagt	caggtaggcc	atgccacttc	catttccagt	agagatttta	55260
ctgagggaca	ctgttagggg	gagggtagag	ttggtggcca	gggtcattct	ttccaggtgt	55320
gggtgcacag	gcagtcacact	gttgcggggg	tgaattttgt	tgccatacta	tctgcttgc	55380
ctctgattct	gatgtcaaaa	gcaaaagagc	agtcatcttt	ttgaagggtac	ctgggcataat	55440
tcctatgatt	gtagacctgg	agtctcaggc	cacagcttct	ccttctgccc	aagggacaaa	55500
ataatgtcat	ctattttctg	ttctttgagg	ctactcttcc	ctgtggattt	taagggaaaag	55560
agtaaggctt	agtgatgggg	aagctgagag	gccccagggc	aggtgggtgg	tgggcctgta	55620
gggtgaggtg	ttactttcac	actcaagtca	gaacaggtgt	gctgggggtt	tgaccttctg	55680
cagcaaaaatt	tcctcctca	gaaacttagt	atgggtgttcg	gtttcaggat	taatagaaca	55740
aaatgccagc	tgacacagcat	gtgttccctgt	aatatttttc	attatatggc	tttgattatc	55800
cttttgtgaa	tctctcacia	ctttaagttg	ttagttctta	gatgttttct	cagtaccttt	55860
ggcttgaagg	agtgatactc	atcttttgtt	tttgtttgag	acagggtctc	actctcaccc	55920
aggctgggtg	gcagtggtcat	gatctcagct	cactgcaacc	tccatctccc	aggttcaagt	55980
gattcttggtg	cctcagcctc	ctgagtaact	gggaatagag	gtgcgtgcca	ccacaccggg	56040
ctaattttttt	tttttttgag	acagagtctc	gctctttcgg	ccaggccaga	gtgcgtgttg	56100
caatctcaac	tacttgcaac	ctccacctcc	cagggtcaag	cgattctcct	gccttagcct	56160
ccctgagtag	ctggaccggc	acactccacc	atgcccggtc	aatttttgta	tttttagtag	56220
agacagggtt	tctccatgtt	ggccagggtg	gtctcaaaac	tcctgacctc	agtaatccac	56280
ccaccccgcc	ctccaaaagt	gctgggatta	cagatgtgag	ccaccacgct	cggccttttt	56340
tttttttttt	ttttttttga	gatggagtct	ttctctatca	cccaggctag	agtgcgtgag	56400
tgtgatctcg	gatcactgca	gcctctgcct	cctgggttca	agtgtattctc	ctgcctcagc	56460
ctcccaagta	gctgggatta	caggtagcctg	ccaccatgcc	cggctgattt	ttgtattttt	56520
agtagagacg	gggtttcacc	atcttgcca	ggctgggtctc	gaactcctga	ccttgtgatc	56580
cacctgcctt	ggcctcccaa	agtgtcggga	ttacaggtgt	gagtcaccgc	acccagccct	56640
attttaattt	ttttaaaagag	agagataggg	gccaggcacg	gtggctctcg	cctgtaatcc	56700
cagcactttg	ggaggccaag	gtgggtggat	cacctgaggt	cgggagttcg	agaccatcct	56760
gaccaacatg	gagaaactct	gtctctacta	aaaatacaaa	attagctgag	cgtgggtggcg	56820
cgcgccgtga	atcccagcta	cttgagaggc	tgaggcagga	gaatcacttg	aaccaggag	56880
gcgagggttg	cgggtgaacgg	agattgcgcc	attgcaactcc	agcctgggtg	acgagagaaa	56940
ctgtctcaaa	aaaaaaaaaa	gagaaagaga	gataggatct	cgctctgtca	tctagggtca	57000
agtgctagtg	aatgatcata	gatcactgta	gccttgaaact	cctgggcaca	agtgtacctc	57060
ttgcctcagc	ctcccgagta	actgcgacta	caggtagcatg	ctaccacacc	ccgctaattt	57120
ttaaattttt	tatagatgtg	ggctctcact	ttgttgccca	gactgttatg	gaactcctgg	57180
gctcaaggga	tcctcccagc	ttggcctccc	acagtgtctga	gattatagat	gtgagcctgt	57240
aattatagac	agcttgccct	atttacctgt	tggaaatgaa	gaattatgaa	ttttacattt	57300
cttcaagaaa	aggtttatgg	acttttttct	cttggatttt	cttggatttt	ttctttttaa	57360
ataggttgct	gggtcaaatc	cctgagttga	attatcagct	taaaattaaa	gtgtgcattg	57420
acaagtaagt	actcctatct	tagctctgtt	tttcaaatga	ggaatagaaa	aatgagaact	57480
ttgacagaca	tcatttgaa	tagagactct	gtctttattc	agagatcttc	attttgtgga	57540
caaaaagttt	caaaaagcctt	ggggtgcatt	gtcattttacg	tgtctgaaca	aagccacaaa	57600
gctgggggta	cagatttgat	ttgtgggtgc	tattgtgaca	accagtcctt	cttttcttg	57660
tttagttttt	tacttgtaca	tgtcattcat	gcatattata	tataagactg	agatcatgtg	57720
ttaatataacg	actgggatac	gttctgcaaa	atgtatcatt	aggcaatttt	gttgtgcaaa	57780
tggtgtagag	tatatagtc	ttacacaaac	ctgggtggca	gaacctactg	cacacctacg	57840
ctatgtggca	gagcctactg	gtcgtaggct	gtaaacctgt	acagtatgtt	actgtgctga	57900
ataccgtagg	caatttgtaac	acatctcaat	gaagtaggaa	tttttcagct	ccatgataat	57960
cttatgggac	caccatcata	tatgcatttt	gttgttgacc	gaaacgtcgt	tatatattct	58020
ttccatacat	agcatgtgga	aagaatagat	ctcttttttt	taattgttcc	acactttacc	58080
atataatgga	atagcgaaaa	tttcacaata	cctttcagga	tgtaaaatac	atataccctt	58140
tgacgacatt	agaaaagaga	aatgtgggc	cgggcgcggg	ggctcatgcc	tgtaatccca	58200
gcactttggg	aggccgaggc	gggcggatca	cgaggtcagg	agatcgagac	catcctgggt	58260
aacacgggtg	aaccccgctc	ctactaaaaa	tacaaaaaaa	ctagctgggc	gtgggtggcg	58320
gcacctgtag	tcccagctac	tcaggaggct	caggcaggag	aatggcatga	acctgggag	58380
tggagtttgc	agttagccaa	gatcacacca	ctgcactcca	gcctgggcga	cagagactcc	58440
atctcaaaaa	aaaaaaaaaa	gaaaagaaaa	gagaaaatgt	ggctgggcgc	gggtggctcac	58500

gcctgtaatc	tcagcacttt	gggaggctga	ggtgggcaga	tcacctgagg	tcgagagttc	58560
gaaaccagcc	cgaccaacat	ggagaaacct	tgtctctact	aaaaatacaa	aattagccag	58620
gtgtgttggc	gcatgcccg	aatcccagct	acacggggagg	ctgaggcagg	agaatcactt	58680
gaactcagga	ggtggagggt	gtggtgagcc	gagatcacac	cattgcactc	cagcctgggc	58740
aacaagagcg	aaactatctc	aaaaaaaaaa	aaagaaaaaa	gaaaagataa	aatgcattct	58800
tatttttagt	tgatgtaatt	atgtggaaat	ttcatgagga	tgactgggaa	aataatgaaa	58860
taagggagtt	gacgaagggt	gtaggtttaa	taagtacata	tgcaatatga	aacatagggt	58920
ccccttccta	tggggaggca	accaaactgt	cctgctacgc	agagggtgta	tggtgcgctg	58980
atcaactgta	actgaatagt	ttaaagaaat	gcccaggagc	acagagggtt	tttcatgaca	59040
gtaataaaca	ggtgggtcaa	gtaggctttt	tgaagaaaca	cagagcctat	tttattaaca	59100
acagtcctgt	ttcttacaga	gactctgggg	acgttgacgc	tctcagaggg	taagttcagc	59160
ctagaggctt	ccttttgttc	cgtttaacct	aaacttcatcc	tccggctact	tggtcaccta	59220
catagttgat	tggtccctgt	tgattcagat	ccgggaaatt	taacattctg	ggcacaaaaca	59280
caaaagtgat	gaacatggaa	gaatccaaca	acggcagcct	ctctgcagaa	ttcaaact	59340
tggtatgtgg	gaggagctcc	ccttcacaaa	gggctctggt	ctgccggaga	gggctaggga	59400
gagcctcaca	ggacacctgc	ccttttcttt	tcttacagac	cctgagggag	cagagatgtg	59460
ggaatggggg	ccgagccaat	tgatgatgaa	gttttgttgg	ggatgaaaga	caactggggt	59520
gttttccttg	agggagagag	gggtaaagat	ccttcttaat	cccagaatt	agaaacatca	59580
acctgttctt	tcagctgtag	ttattccaaa	cctgcacttc	aggccaaagt	gacatgaaca	59640
gaagttccat	gtgccatgga	gctctctggc	ttggaacatt	tccgtgaata	tctgggagtt	59700
ggctcctcct	taaggagaag	tggaaagtcc	cctgctgagt	tggtctccac	acccatgtgg	59760
tataaagcag	ccttccacct	tgctctgggc	tttccaaatt	ccccatccag	ctcctgcggc	59820
tgacctgct	tggtccatt	tttagtgccc	tgttttctc	tccactgag	gtgggataga	59880
gggtgtaaaa	gcaacagatt	tgagttaaac	tttaaaataa	atgaccacct	tgcattagct	59940
tgcttaggaa	aagagtacat	aaaataaaat	gaacaaacaa	aaacccatct	tggtctttat	60000
cccccttatt	ttctgctttt	cattgattca	gattattgga	ttcttattgt	caagaataaa	60060
ccttaaacaa	acaaacaaaa	aaaggtaaat	gtgacggaag	gctagttttc	agtcattttt	60120
aaaaattgtg	atgccccgtt	ccttttctta	catttgcctc	ctgaacaatt	cctcctcttt	60180
aaaatgtagc	agtccctagt	gggcgtgctg	gctcacaccc	cgtacttttg	gatgccaaag	60240
caggctgggc	acttgagggt	aggagttcaa	gaccagcctg	gccaacatgg	tgaaagcccc	60300
tctctactaa	agatacaaaa	attagctggg	tggtggtggt	cacgcctgta	gtcccagtta	60360
ctggggaggc	tgaggcatga	gaatcgcttg	aacctgagag	gtggagcttg	cagttagcca	60420
agattttgcc	actgcactct	agcctgggca	acagagtga	actctgtctc	aaaaaaataa	60480
ataaaataaa	atgtagcagt	ccttttttaa	aatgtggaat	tttacttgac	agtagagtga	60540
agtagcctgt	atgcaatgat	atgggaaaa	gtacatgaca	tattaagaaa	aagcaaaatg	60600
taaaataaatt	tgaatgtat	tattagtata	tgtgttttaa	aaatacacta	tactcttatg	60660
tgtattcata	tgtatattaa	gaaattctgg	aggaatatac	cagcagtgtc	atgtgtatta	60720
gtgctgctgt	tggtatccat	ggctattcta	gactgtctct	gtgatatttg	catttttaac	60780
tgaatatatt	actttttata	tcagaaaaat	agtattaaaa	atgaattata	atttaatttc	60840
ttttttcttt	tttttttttg	agtccggagtc	tcgttctatc	ggattgcagt	ggtgcgactc	60900
cagctcactg	caacctctgc	ctcctagggt	caagcgattc	tcctgtctca	gcctcccaag	60960
tagctgggag	gatagggtgca	tgccaccacg	cctggctaatt	ttttgcattt	ttagtagaga	61020
cagggtttca	ccatattggt	caggctgggt	ttgaaactct	gacctcgtga	tccaccctac	61080
tcggcctccg	aaagtgcctg	gattacaggc	atgagccgct	gtgccagac	tagaattcaa	61140
tttttgagaa	ttcattgaca	actcttactt	aaaataagggt	tgctgtactg	atgtgagaca	61200
ttgtttagt	cagtttgga	aacaatttgg	cagtataaaa	atgaacatac	ctgtaaacca	61260
acggtgccat	tcccaggatt	taatagcaga	gaaatctttg	catatatgtc	ccaggagaca	61320
tatataaagt	ggacatcagc	ctgattataa	gctctaaatg	caacccaaat	aaatacccat	61380
caacattaga	atgaatacat	tatttgggt	atagacacaa	tggaatactc	cgcagctgtg	61440
aaaagggaata	cactgcagat	acacataaac	atgtggattc	atttcacatc	aagtgaagag	61500
tgaatcccaa	agaattcat	tggagctccat	aagtgtagg	ttcacaaatg	tcccaaacta	61560
aacaatacct	gcattgctta	gataaacaaa	tatggtaaaa	ctgtaaaaaa	acaaaacaaa	61620
acaagacaaa	aagggtcagg	aaatgataaa	cccaaaagac	aaaatagcag	ttatttctga	61680
gggaggagg	aaggggatgg	ggttggggaa	gggcacccag	agaatttttag	gagtgatgga	61740
ccttttctta	aattgaatgg	tgggttcata	ttgttttgtt	attctttgtg	ccttacgtat	61800
tttacaata	accaattgga	tctatgtaat	attataatac	aaactgagta	aaggattagg	61860
ttgaggatca	cagcattgga	agttcttgg	gttgaagaga	gtaagtgcg	agcaagtgtg	61920
gtccctggca	gtttgtttgt	gaccactgg	tggttacc	ttcttgggtg	ggtgaggtct	61980
ggcatgtcac	tttcttggc	tggtgctgtt	agtactgaat	gccattctct	ctgaggaaaa	62040
gtgtccttct	cctttttatt	gattgactga	ttgattgaga	cagagtctca	ctctgtcacc	62100
caggctggag	tgagtgggc	tgatctcggc	tcactgcac	ctctgcctcc	tgggttcaag	62160
cgattctcct	gcctcagcct	cctgagtagc	tgggactaca	ggcgcccaact	accacacca	62220
gctaactttt	gtattcttag	tagaaacggg	gtttcaccaa	attattggcc	aggctggtct	62280
cgaactcctg	accatgtgat	ccacctgcct	cgccctccca	aaatgctggg	attgtaggtg	62340
tgagccatca	cgctcagcct	ttttttttat	ttaatttaat	ttttttttta	gacagggtct	62400

cactctgtca	ccccagctag	agtgcagtgg	cacaatcata	gctcgctgca	gcctccatct	62460
cctaggctca	agccatcctc	ccacctcagc	ctctcgagta	gctggggcta	taggtgtgca	62520
ccaccacacc	cagctaattt	ttgtatTTTT	tgcagagatg	gagttttgct	gtgctgctta	62580
gactgggtctc	gaactcctgg	gctcaggcaa	tcctcctgcc	ttggcctccc	aaagtgtctgg	62640
gattacaggc	atgagccacc	acacctggcc	taagagtgtc	cttctcgtta	ctgtaggctt	62700
ccctgattgt	gactgaggag	ctgcacctga	tcacctttga	gaccgagggtg	tatcaccaag	62760
gcctcaagat	tgacctagag	gtaagttctg	cagcagaatc	ggtgagaggc	tacgtacagg	62820
ggtgactcag	gacaaaaact	tcacctggga	tttttacaag	agaagggtga	atgattactg	62880
tttgcttaac	actgtgttta	tttttgctta	cttttctcca	aaaaaatcct	tggcatccca	62940
tctggcaata	aagtcttgct	tgaatgctta	gaagatgtgt	gtatattcag	ctttcagcaa	63000
acttgatatg	aaaatctcta	tttagaaatt	gattggccgg	gcgcggtggc	tcacgcctgt	63060
aatcccagca	ctttggggagg	ctgaggcggg	tggatcacga	ggtcaggagt	tcgagaccag	63120
cctggccaac	atgacgaaac	ccgtctcta	ctaaaataca	aaaattagct	gggtatggtg	63180
gcggacgcct	ataatcccag	ctactcggga	ggctgaggca	ggagaatcac	ttgaacctgg	63240
gaggcagagg	ttgcagttag	ctgagattgt	gccattgcac	tcacgcctgg	gtgacagagt	63300
gagactccgt	ctcaaaaaaa	aaaaaaagaa	attagaactg	actttataaa	gtttgggcat	63360
aagagtctta	gcagccagtg	tgttttagtat	acagaaaatt	gtggcaatga	cattctcctt	63420
tcccaacttt	cttgattttt	aaattaagat	atacctagaa	aagcaggaat	cctggtcttt	63480
gattcctgag	acctccctgt	ttcatgtgaa	gatacagctt	caagtcttgg	agaatgcctc	63540
caaggtctta	aaaatgggga	atctgtggat	tgtgagtcaa	gctttgagca	agtcagggtt	63600
tacaagggac	cggtatatte	cgactgcagc	ctgagttgtg	tggccacgct	gggcattctt	63660
tcactatga	gtgctcactg	agctgactca	ctcacactcc	tcgcctagag	ttggcagcag	63720
gtgtggttta	tgcatgtccc	tttcattctg	agccccgtga	gatgcgggtg	aagagatttc	63780
caaggtcttg	agagccctc	tgctcctccc	gctcagtcct	cactccctcc	gcagaccac	63840
tccttgccag	ttgtggtgat	ctccaacatc	tgtcagatgc	caaatgcctg	ggcgctccatc	63900
ctgtggtaca	acatgctgac	caacaatccc	aagggttagtg	ccccctcctt	ttagttggtg	63960
ccccgggatc	tcttgcgact	taggggtacc	tagtatagac	aatgagcacc	atccctcatc	64020
taaacaagca	aatgtgttct	ttccaataga	atgtaaactt	ttttaccaag	cccccaattg	64080
gaacctggga	tcaagtggcc	gaggtcctga	gctggcagtt	ctcctccacc	accaagcgag	64140
gactgagcat	cgagcagctg	actacactgg	cagagaaact	cttgggtccg	catttcaccc	64200
cttctccctc	ccgcccaccc	gcccagaaaa	gggatccggc	ccatagggct	gttcatttgg	64260
gccatgtcta	ctgagcatta	ggccatgttt	ctttcctgag	caaggcgctg	tgtgtgtgcc	64320
aggaaacagg	ggagttgggg	agttgggggtg	cagagacagt	ttgcagtttt	cagtcgaggt	64380
gatcattttt	gaggtgggag	gtagatttct	tttctcctgg	ttgctgtctc	attcacccac	64440
tctatctaac	tttagaagat	cttttaagtg	tgtgttgga	ggtggcacta	aaggetttag	64500
attccctgtc	cattttttta	ataaactata	ggctagtggg	ttttttttgt	cttattttat	64560
ttattttattt	atttttttga	gacgagtctt	gctctgttgc	ccaggctgga	gtgcagttagt	64620
gtgatctcgg	ctcactgcaa	cctccgcctt	ctgggttcaa	gcgattcttc	tgctcgggcc	64680
tcccagtag	ctgagactac	aggtgctcac	caccacgccc	agctaatttt	tgtattttta	64740
gtagagacgg	ggtttttacca	tgttggccag	gatagtctcc	gtctcttcac	ctcgtgatcc	64800
gcccacctcg	gcctcctaaa	gtgctgggat	tacaggcttg	agccactgtg	cccagcgtag	64860
gctagttttt	aaaaaagaat	tagtggaata	ttttatgtgc	cacctgggct	agaagtagct	64920
ttgttctaatt	aaagctgttg	ccaccaata	cacctgtctg	acaccgatg	tcagcttgtt	64980
agttagtgct	gctgttggtt	cccagcctac	cacccgaggt	tgggaagagc	agggggactt	65040
gttatatcac	cctccatccc	tgctgggcta	cccagcaaca	caagttagtc	aaatgatggg	65100
atagtgtttg	tctcatgtg	cacacacaca	ccttcgcta	ccttcaaaga	tgtgaaagct	65160
gattattttg	tggccccattg	tgggatgaat	gtgtgtgtgt	tctgttttaa	gaaataacct	65220
cttgacccca	agctgaaaat	gtactacttg	actctttttc	tttccttcag	gacctggtgt	65280
gaattattca	gggtgtcaga	tcacatgggc	taaattttgc	aaagtaagca	atcttgttaa	65340
attctcgtgg	gaatgggaat	gctcacctgc	acggctgtcg	ttgagggtc	tggcttgaag	65400
gcctgaact	cttggtccag	cggccagtag	gacctgcctg	aaggtagacg	ggcctgagga	65460
tttgggtgat	gcactgcacc	cctagggaag	gaagggtctg	gatggcagta	gacttggtt	65520
tcccattact	cttttctcca	ggaaaacatg	gctggcaagg	gcttctcctt	ctgggtctgg	65580
ctggacaata	tcattgacct	tgtgaaaaag	tacatcctgg	ccctttggaa	cgaagggtag	65640
ggttgacaga	gtgtgcacag	atgtaaccaa	gtcccctgct	ctcagcaagc	cagtggcagg	65700
ggatggatgc	cctgttagca	ataacaacat	tgttcctcct	ccttggtctc	aggtacatca	65760
tgggctttat	cagtaaggag	cgggagcggg	ccacttgag	cactaagcct	ccaggcacct	65820
tctgcttaag	attcagtgaa	agcagcgaag	acagggcgt	cactttcact	tgggtggaga	65880
aggacatcag	cggtaaggga	ggctcccacc	caccccacct	gctggtggct	gctgaggcct	65940
catcactgct	tctagttgca	agcacctact	gccccctggt	gggtggagat	ggccttgact	66000
ccctgtttca	ctcagactcg	caaaacacat	ttgcgtgact	tctaaatcct	tccagctgaa	66060
ggattggttt	gctttgtttt	gcttgctcca	gtgactattt	gttgagaatt	ttgcaattta	66120
aatgtatttc	ttcatctctt	tttctactta	accctgttaa	tatatcttac	gcaagtgcgt	66180
atattcaagt	ttattttcta	tgacccaact	agtagcctct	tcttaattag	aagccagcct	66240
gaatatttcc	acagtgccag	gccactgaac	aggggtgtca	gggtctcaac	actaggggtg	66300

cttaagtctt	ttcccccttcg	aggaaagaaa	aaatgggcag	ttttctctga	gatgacctag	66360
ctgtagggtc	catgatcttt	ccttcccatg	tcctgtgaca	ggtaagacct	agatccagtc	66420
cgtggaacca	tacacaaagc	agcagctgaa	caacatgtca	tttgctgaaa	tcatcatggg	66480
ctataagatc	atggatgcta	ccaatatcct	gggtgtctcca	ctgggtctatc	tctatcctga	66540
cattcccaag	gaggaggcat	tcggaaagta	ttgtcggcca	gagagccagg	agcatcctga	66600
agctgaccca	ggtagtgtgt	gattttccat	gttcctggca	tttaattttt	gggaaaagtt	66660
ggaaattttg	ggatccttgg	aggatagata	ggcaaagtc	tgaataacct	gggggataat	66720
tatttctcct	tatgggaaag	aattgtagt	agtgcctttg	ttgggggtgac	cgatgggatt	66780
tgagaggaga	atcagaatca	cttagagtag	tgtagtctct	gctccacaga	gagtgcata	66840
gtctaagag	gggatacagc	ctgggcaata	tgggtgaaacc	tcgtctctac	aaaaaatcca	66900
aaaaaattac	cgggtgtggg	ggcacgcatt	tgtagtctga	gctacttggg	aggctgaggt	66960
gggaggatca	cctgagccaa	ggagttcaag	gctgtagtga	gcggtgatca	tgccaccgca	67020
ctccagcctg	gctgatagag	tgagatactg	tgtcaaaaaa	taaaaataaa	gaggggatca	67080
atcacacatac	gtccccaaa	acatgcctga	aacacgagaa	gggaaagtga	gggcagttaa	67140
caggatgccc	tgctggcaca	gtgcttctta	gtagatgcta	gaagggttga	ggcccagatt	67200
tcagcccagc	atatggcttt	ttgcctgtaa	ctgaaccatg	tcagtgtgcc	agatgggtctg	67260
aagaaagggg	ttctggaggga	aattattatt	agctgcatgg	gagtatgggt	tacactagag	67320
tagaagagct	gggagcatca	cgtttgaagg	ggaagacagt	gactgggtgg	aggggcaagg	67380
gattagtatt	tagagtgtgc	aactattgaa	aataaggtat	attttaatgt	gtaagaggac	67440
atgtacttat	atgttatata	taaattattt	tagctgggtg	aagtggctca	tgccatagat	67500
cctagcactt	tgggaggccc	aggcgggagg	atcacttgag	cctgggagtt	tgagaacagc	67560
ctagacaaca	tagtgagacc	ctatctatac	aaaaataatt	tttttttaaat	tagccacgtg	67620
tggtgggtttg	tgctgttagt	cctagctact	cgggaggctg	agggtggagg	attgcttaag	67680
cccaggagggt	tgaggctgca	gtgagccatg	atcgaccac	tgcaactccag	cctgggtgac	67740
agagcaagac	cttgactcac	caaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	agagagagaa	attaaaaata	67800
ctgtaactctc	agctgggcat	gggggttcac	acctgcagtc	ctagcacttt	gggaggctga	67860
agcaggaggga	tcactttgagg	ccagggaactc	aagaccagcc	tggaacata	gcaagacccc	67920
actacacaca	cacacacaca	cacacacaaa	gaagagaaag	aaaaaaacga	aacaaaactg	67980
taatctctgc	agctgtcctc	agtgtggagg	gggtagccct	gtctgttccc	cttcagcact	68040
tgctgttttg	actctctggg	ttctttgtgc	aggctctgat	ggggagtctc	tggtttgcca	68100
ttctttgttt	gattttaactt	tctgtaatca	taaagccaat	gatgggcttt	tttttttttt	68160
tttttttttg	actaaagtctt	gctctatcac	ccaagctgga	gtgcagtggc	acctctcgg	68220
ctcactgcaa	cctccacctc	ccggttcaag	caattctcct	gcctcagcct	cccagtagtc	68280
tggtgattatg	ggcttgtgcc	accatgccc	gctgattttt	gtattttttg	tagagaaagg	68340
gtttcgccat	gttgccagg	ctggcctcga	actcctgacc	tcagggtgatc	tgcccacttc	68400
agcctcccaa	agtgtcggga	ttacaggcgt	gagccactgt	gcctggccta	atgatgggct	68460
ctttaatgtg	atccttttagg	gttggcgcc	tgccctagtt	gctgttgaaa	aaactatttt	68520
tgtccaaata	gcacacacac	agaaacctac	caacttccct	cccacttttt	cctaggaatt	68580
ccttctgagg	gatttcttga	gatggggcag	aatggggctt	ggaagaggga	gttggagcta	68640
attgaccgtt	gcctttctcc	tttggtgggg	tcctgagtct	tgttctctgt	gtaagagtta	68700
ctcacttctc	gtctgccacc	tatctccctt	tgcatgtgtg	cttcagttgg	gagatctgtt	68760
tatcagcccc	tgccacacgg	ctctttgttc	cttctgcaga	ggacgttggg	gtcccacggc	68820
tggtcctttt	gactcatttt	gctttcaagg	tcccacctcc	cagtctgagg	ctgcactctc	68880
cattaccatc	gccttctcct	tggtgtggga	ggccaggtcc	tttctctgcc	acgatctgtca	68940
gcgtttctct	agggggccagg	cactcatcag	gagaaaggaa	ctaattactt	gagtaatttt	69000
ccttgccctg	ctgagaggag	tgtgccctga	gggactccat	gtgagtgtgg	tgacgggtgt	69060
gggggtgtcc	ctgtgttatt	ttaaaatggg	tgccctcagg	acgatgagca	tgtgaccatt	69120
tcctctctat	ttccatcaca	agagtattat	ggtagagggt	tctcagggtta	gattatcctc	69180
ccaagactct	tctctcttcc	ttctctactg	gataaccaca	tagcatttcc	ttatggcttg	69240
aggagagggt	tcgtgcccac	ttacaaatta	gaaaagctac	atttacaatc	ttgtacaaag	69300
ccacacaatg	aagtcatttt	tctcagcttt	tttttttttt	tttttttttt	ttttgagcct	69360
gagtctcgct	ctatcgtcca	gactggagtg	cagtggcgcg	atcttgcttc	actgaaacct	69420
ctgcctccca	ggttcaagag	attctcatac	ctcagcctcc	tgagttagctg	ggattacaga	69480
catgcaccac	tatgcctggc	taatttttgg	attttttagta	gagaccgggt	ttcaccctgt	69540
tggtccaggct	ggtctcgaac	ccctgacctc	aagtgatctt	ccgcctggg	cctcccaag	69600
tgtctgggatt	ataggtgtga	gccacagtg	cagccttgt	ttttgttttt	gtttgttttt	69660
gacagtctgt	cactctgtca	cccaggctgg	agtgcagtgg	tgcatctca	cctcacttca	69720
gcctctgcct	cccagggtca	agtgttctc	ctgtctcagc	ctcctgagta	gctgggatta	69780
caggcgtgcc	accacgcccc	gctatttttg	taatttcatt	aaagacaggg	tttcccatg	69840
ttggtgaggc	tggtcttgaa	ctcctggcct	caagtgatcc	acctgcttca	gcctcccaa	69900
gtgcagggat	tacaggcatg	agccactgtg	cctggcctca	gctatcttga	atgctggaga	69960
attaaatcct	ttctgtctca	gggtgtcagc	tccttaaggg	ctgggcaaaa	acagttggat	70020
ttataagaca	ctagagtctt	gcctcagtag	ctcctttgaa	ttctgcactg	aattgatcag	70080
tttcttggcc	caaagtaaac	tcagatggca	gccccagagc	cactctgcag	tgccctcttt	70140
cacatgggtca	tcagtctctc	tgatccctca	ggttctgtct	aagcctcatg	ttttatgacc	70200

gtgctgttct	cagcccacct	caccctgccc	catgccttct	caatggtttg	ttcacctgaa	70260
ttccccagat	ttcatgccag	tatccccaa	gttccttgac	ctcttggtgt	aagcattcag	70320
catctaaaat	tcattttatt	cccgtaacg	cattttctaac	tgtagaacaa	gaattataaa	70380
tgacaaagct	catagaaaat	tggcaccttg	tcttccccct	ccctcttatt	ttatacataa	70440
aagagaatat	gggctgggca	ttgtggccaa	ggctgggcat	gatagctcat	acttgtaatc	70500
cagcactttg	ggagggtgag	gcagatggat	cacctgaggt	caggagttca	agaccagcct	70560
ggccaacatg	gtgaaacctc	atctctacta	aaattacaaa	aaaaaaatta	gctaggcatg	70620
gtggcagatg	cctgtaatcc	agctactcag	gaggctgatg	aaggagaatc	acttgaacct	70680
tggaggcaga	ggttgtagag	agccaagatg	gcgctactgc	actccaacct	gggcgaaaga	70740
gagcaagact	ccgtctcaaa	aaaaaaaaag	acaaaaatta	gccaggcatg	gtggtgccac	70800
ctgtagtccc	agctgcttg	gagcctaagg	caggagaatc	gttttgacct	gggagtagga	70860
ggttgcggtg	accgagattg	tgccactgca	cttgagcctg	ggcaacagag	tgagactctg	70920
tctcaaaaac	ataagaacaa	cagcaacaaa	agagagagac	catgccttgc	tccaggtctc	70980
ttagctattg	aagatgtacc	tggaccagg	tctctcggtc	tctagttgaa	gcaattgtac	71040
tgccttacaa	agtcacattc	tctttggtgc	tttttgattg	acgtatttat	ccaactgaa	71100
agttactcat	gccctcatcc	aaaaatgtgg	tagaggccag	attagtgtctg	gtaggaataa	71160
gagatataac	ctttggcttt	ggaaccacaa	gcattagcag	tctccatgtt	ctttaaagac	71220
ttggtgatata	tggatatttag	gctggacacc	atgcaaagac	tacacaggct	cggttcctgc	71280
atgcagagaa	gttatctaag	agatatgacc	aggccggaat	agaatgctca	gaccacgtgg	71340
aggctgttaa	acttttacat	aatctagggg	aagaaggggac	acaagggtggc	attagtctag	71400
ggtcaggttg	gaaaagggtta	tgtctgaaag	tctctgcagc	tcaggacagc	tttgtgcaa	71460
gaactgaagt	tcacagctgc	tagtgcctgg	gagatcaaat	agtataaatg	agggcagaca	71520
accctgaggg	gcagatggag	ctttccagac	aatcttggca	tgaggatgag	tgagtttcaa	71580
atcagtcctg	ccgaggcaga	tggcttcctc	cagctctgct	tactgaatgc	gaagtcacag	71640
tcaagtaaga	aactgggttt	cttcttccca	ggcgctgccc	catacctgaa	gaccaagttt	71700
atctgtgtga	caccgtaagt	ggcttccttt	ccccgttttg	ccttcatttc	taatatcctc	71760
agttatccct	gggaatggga	cactgggtga	gagttaatct	gccaaagggt	ggaagccct	71820
gggctatggt	tagtactcaa	agtgaccttg	tgtgtttaaa	aagcttgagc	ttttattttt	71880
ctgttgagga	ccagagtttg	atggcttgtg	tgtgtgtgtt	ttgttctttt	ttttttttcc	71940
attgtgtctt	gtcaaccccc	cgtttccctt	cctgtgccc	cccatttctt	acagaacgac	72000
ctgcagcaat	accattgacc	tgccgatgtc	ccccgcact	ttagattcat	tgatgcagtt	72060
tggaaataat	ggtgaagggtg	ctgaaccttc	agcaggaggg	cagtttggtg	agtatttgg	72120
tgacagactt	tgtccctata	agggaagttg	gtcccccttg	tgtgatgctc	tcacatgtac	72180
acaccgagag	ctgtgctact	ggaatggtag	gagattctag	agctttgctt	tccaaaagag	72240
atggtatgaa	tgccacatgt	gtgagtataa	atcttctagc	agccacactg	gaaatagacg	72300
aacttaattt	ttacaatata	ttttatttaa	cccactaaat	ccaacatact	ctcaatttaa	72360
catttcagaa	aaagttgagg	ctgggtgagt	ggctcatgcc	tgtaatccca	gcactttggg	72420
aggccgaggt	gggtggatca	cttgagggtca	ggagttcgag	accagtctga	ccaaaatctc	72480
taaaatataa	aaattagctg	ggcatggtgg	cgcatacctg	taatcccagc	tactcaagaa	72540
gctgaggttg	gaggatcgct	tgagcctggg	aggtggaggg	tgcaagtggc	agagatcggt	72600
ccactgcact	ccagcctggg	cgacagatg	agactccatc	tcaaataaac	aaaactaaac	72660
taaaagaaa	aagttgagac	ctttttttat	tctttttttt	catactaagc	ctttaaaatc	72720
cagtgggctt	ttgacagcca	cagcacagct	cagtttggtg	aaaccaaata	tcaaatagct	72780
ggtggccacg	tgtgtctcgg	ggctcctgaa	ttaaacagta	gatcaagggc	agaagatctc	72840
aggacagcct	tagagcttct	gtaaacatgg	agctctggga	atcagtttaag	gtgggaatga	72900
gaaagagccc	ttcccagagg	agggtcctcc	aggagaggag	gtaaatctgg	cttttctgac	72960
catccctggg	ccttaagggg	caggagattg	gtagcagtg	gtagcctggg	ccctgtcctc	73020
tgaagggctg	ggggcggtgg	ctgccagttg	cagaggggtg	acaactgaac	tagttttccc	73080
tgtctgtccc	tccagagtc	ctcacctttg	acatggagtt	gacctcggag	tgcgctacct	73140
cccccatgtg	aggagctgag	aacggaagct	gcagaaagat	acgactgagg	cgcctacctg	73200
cattctgcca	cccctcacac	agccaaacct	cagatcatct	gaaactacta	actttgtggt	73260
tccagatttt	ttttaatctc	ctacttctgc	tatcttttgag	caatctgggc	acttttaaaa	73320
atagagaaat	gagtgaatgt	gggtgatctg	cttttatcta	aatgcaaata	aggatgtgtt	73380
ctctgagacc	catgatcagg	ggatgtggcg	gggggtggct	agagggagaa	aaaggaaatg	73440
tcttgtgttg	ttttgttccc	ctgcctcct	ttctcagcag	ctttttgtta	ttgttgttgt	73500
tgttcttaga	caagtgcctc	ctggtgcctg	cggcatcctt	ctgcctgttt	ctgtaagcaa	73560
atgccacagg	ccacctatag	ctacatactc	ctggcattgc	acttttttaac	cttgctgaca	73620
tccaaataga	agataggact	atctaagccc	taggtttctt	tttaaattaa	gaaataataa	73680
caattaaagg	gcaaaaacaa	ctgtatcagc	atagcctttc	tgtatttaag	aaacttaagc	73740
agccgggcat	ggtggctcac	gcctgtaatc	ccagcacttt	gggaggccga	ggcggtatcat	73800
aaggtcagga	gatcaagacc	atcctggcta	acacggtgaa	accccgctc	tactaaaagt	73860
acaaaaaatt	agctgggtgt	ggtgggtggc	gcctgtagtc	ccagctactc	gggaggtga	73920
ggcaggagaa	tcgcttgaa	ctgagaggcg	gaggttgag	tgagccaaaa	ttgcaccact	73980
gcacactgca	ctccatcctg	ggcgacagtc	tgagactctg	tctcaaaaaa	aaaaaaaaaa	74040
aaaagaaact	tcagttaaca	gcctccttgg	tgttttaagc	attcagcttc	cttcaggctg	74100

```

gtaatttata taatccctga aacgggcttc aggtcaaacc ctttaagacat ctgaagctgc 74160
aacctggcct ttggtgttga aataggaagg tttaaggaga atctaagcat ttttagacttt 74220
tttttataaa tagacttatt ttccctttgta atgtattggc ctttttagtga gtaaggctgg 74280
gcagaggggtg cttacaacct tgactccctt tctccctgga cttgatctgc tgtttcagag 74340
gctagggttgt ttctgtgggt gccttatcag ggctgggata cttctgattc tggttcctt 74400
cctgccccac cctcccgacc ccag 74424

```

<210> 154

<211> 3455

5 <212> ADN

<213> H. sapiens

<220>

<221> CDS

10 <222> (241)...(2553)

<400> 154

```

ggttttccgga gctgcggcgg cgcagactgg gagggggagc cgggggttcc gacgtcgcag 60
ccgaggggaac aagccccaac cggatcctgg acaggcaccc cggcttggcg ctgtctctcc 120
ccctcggctc ggagaggccc ttcggcctga gggagcctcg ccgcccgtcc ccggcacacg 180
cgcagccccg gcctctcggc ctctgccgga gaaacagttg ggaccctga ttttagcagg 240
atg gcc caa tgg aat cag cta cag cag ctt gac aca cgg tac ctg gag 288
Met Ala Gln Trp Asn Gln Leu Gln Gln Leu Asp Thr Arg Tyr Leu Glu
1 5 10 15

cag ctc cat cag ctc tac agt gac agc ttc cca atg gag ctg cgg cag 336
Gln Leu His Gln Leu Tyr Ser Asp Ser Phe Pro Met Glu Leu Arg Gln
20 25 30

ttt ctg gcc cct tgg att gag agt caa gat tgg gca tat gcg gcc agc 384
Phe Leu Ala Pro Trp Ile Glu Ser Gln Asp Trp Ala Tyr Ala Ala Ser
35 40 45

aaa gaa tca cat gcc act ttg gtg ttt cat aat ctc ctg gga gag att 432
Lys Glu Ser His Ala Thr Leu Val Phe His Asn Leu Leu Gly Glu Ile
50 55 60

gac cag cag tat agc cgc ttc ctg caa gag tcg aat gtt ctc tat cag 480
Asp Gln Gln Tyr Ser Arg Phe Leu Gln Glu Ser Asn Val Leu Tyr Gln
65 70 75 80

cac aat cta cga aga atc aag cag ttt ctt cag agc agg tat ctt gag 528
His Asn Leu Arg Arg Ile Lys Gln Phe Leu Gln Ser Arg Tyr Leu Glu
85 90 95

aag cca atg gag att gcc cgg att gtg gcc cgg tgc ctg tgg gaa gaa 576
Lys Pro Met Glu Ile Ala Arg Ile Val Ala Arg Cys Leu Trp Glu Glu
100 105 110

tca cgc ctt cta cag act gca gcc act gcg gcc cag caa ggg ggc cag 624
Ser Arg Leu Leu Gln Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gln Gln Gly Gly Gln
115 120 125

gcc aac cac ccc aca gca gcc gtg gtg acg gag aag cag cag atg ctg 672
Ala Asn His Pro Thr Ala Ala Val Val Thr Glu Lys Gln Gln Met Leu
130 135 140

gag cag cac ctt cag gat gtc cgg aag aga gtg cag gat cta gaa cag 720
Glu Gln His Leu Gln Asp Val Arg Lys Arg Val Gln Asp Leu Glu Gln
145 150 155 160

aaa atg aaa gtg gta gag aat ctc cag gat gac ttt gat ttc aac tat 768
Lys Met Lys Val Val Glu Asn Leu Gln Asp Asp Phe Asp Phe Asn Tyr

```

ES 2 521 599 T3

165	170	175	
aaa acc ctc aag agt caa gga gac atg caa gat ctg aat gga aac aac Lys Thr Leu Lys Ser Gln Gly Asp Met Gln Asp Leu Asn Gly Asn Asn 180 185 190			816
cag tca gtg acc agg cag aag atg cag cag ctg gaa cag atg ctc act Gln Ser Val Thr Arg Gln Lys Met Gln Gln Leu Glu Gln Met Leu Thr 195 200 205			864
gcg ctg gac cag atg cgg aga agc atc gtg agt gag ctg gcg ggg ctt Ala Leu Asp Gln Met Arg Arg Ser Ile Val Ser Glu Leu Ala Gly Leu 210 215 220			912
ttg tca gcg atg gag tac gtg cag aaa act ctc acg gac gag gag ctg Leu Ser Ala Met Glu Tyr Val Gln Lys Thr Leu Thr Asp Glu Glu Leu 225 230 235 240			960
gct gac tgg aag agg cgg caa cag att gcc tgc att gga ggc ccg ccc Ala Asp Trp Lys Arg Gln Gln Ile Ala Cys Ile Gly Gly Pro Pro 245 250 255			1008
aac atc tgc cta gat cgg cta gaa aac tgg ata acg tca tta gca gaa Asn Ile Cys Leu Asp Arg Leu Glu Asn Trp Ile Thr Ser Leu Ala Glu 260 265 270			1056
tct caa ctt cag acc cgt caa caa att aag aaa ctg gag gag ttg cag Ser Gln Leu Gln Thr Arg Gln Gln Ile Lys Lys Leu Glu Glu Leu Gln 275 280 285			1104
caa aaa gtt tcc tac aaa ggg gac ccc att gta cag cac cgg ccg atg Gln Lys Val Ser Tyr Lys Gly Asp Pro Ile Val Gln His Arg Pro Met 290 295 300			1152
ctg gag gag aga atc gtg gag ctg ttt aga aac tta atg aaa agt gcc Leu Glu Glu Arg Ile Val Glu Leu Phe Arg Asn Leu Met Lys Ser Ala 305 310 315 320			1200
ttt gtg gtg gag cgg cag ccc tgc atg ccc atg cat cct gac cgg ccc Phe Val Val Glu Arg Gln Pro Cys Met Pro Met His Pro Asp Arg Pro 325 330 335			1248
ctc gtc atc aag acc ggc gtc cag ttc act act aaa gtc agg ttg ctg Leu Val Ile Lys Thr Gly Val Gln Phe Thr Thr Lys Val Arg Leu Leu 340 345 350			1296
gtc aaa ttc cct gag ttg aat tat cag ctt aaa att aaa gtg tgc att Val Lys Phe Pro Glu Leu Asn Tyr Gln Leu Lys Ile Lys Val Cys Ile 355 360 365			1344
gac aaa gac tct ggg gac gtt gca gct ctc aga gga tcc cgg aaa ttt Asp Lys Asp Ser Gly Asp Val Ala Ala Leu Arg Gly Ser Arg Lys Phe 370 375 380			1392
aac att ctg ggc aca aac aca aaa gtg atg aac atg gaa gaa tcc aac Asn Ile Leu Gly Thr Asn Thr Lys Val Met Asn Met Glu Glu Ser Asn 385 390 395 400			1440
aac ggc agc ctc tct gca gaa ttc aaa cac ttg acc ctg agg gag cag Asn Gly Ser Leu Ser Ala Glu Phe Lys His Leu Thr Leu Arg Glu Gln 405 410 415			1488
aga tgt ggg aat ggg ggc cga gcc aat tgt gat gct tcc ctg att gtg Arg Cys Gly Asn Gly Gly Arg Ala Asn Cys Asp Ala Ser Leu Ile Val 420 425 430			1536

act gag gag ctg cac ctg atc acc ttt gag acc gag gtg tat cac caa	1584
Thr Glu Glu Leu His Leu Ile Thr Phe Glu Thr Glu Val Tyr His Gln	
435 440 445	
ggc ctc aag att gac cta gag acc cac tcc ttg cca gtt gtg gtg atc	1632
Gly Leu Lys Ile Asp Leu Glu Thr His Ser Leu Pro Val Val Val Ile	
450 455 460	
tcc aac atc tgt cag atg cca aat gcc tgg gcg tcc atc ctg tgg tac	1680
Ser Asn Ile Cys Gln Met Pro Asn Ala Trp Ala Ser Ile Leu Trp Tyr	
465 470 475 480	
aac atg ctg acc aac aat ccc aag aat gta aac ttt ttt acc aag ccc	1728
Asn Met Leu Thr Asn Asn Pro Lys Asn Val Asn Phe Phe Thr Lys Pro	
485 490 495	
cca att gga acc tgg gat caa gtg gcc gag gtc ctg agc tgg cag ttc	1776
Pro Ile Gly Thr Trp Asp Gln Val Ala Glu Val Leu Ser Trp Gln Phe	
500 505 510	
tcc tcc acc acc aag cga gga ctg agc atc gag cag ctg act aca ctg	1824
Ser Ser Thr Thr Lys Arg Gly Leu Ser Ile Glu Gln Leu Thr Thr Leu	
515 520 525	
gca gag aaa ctc ttg gga cct ggt gtg aat tat tca ggg tgt cag atc	1872
Ala Glu Lys Leu Leu Gly Pro Gly Val Asn Tyr Ser Gly Cys Gln Ile	
530 535 540	
aca tgg gct aaa ttt tgc aaa gaa aac atg gct ggc aag ggc ttc tcc	1920
Thr Trp Ala Lys Phe Cys Lys Glu Asn Met Ala Gly Lys Gly Phe Ser	
545 550 555 560	
ttc tgg gtc tgg ctg gac aat atc att gac ctt gtg aaa aag tac atc	1968
Phe Trp Val Trp Leu Asp Asn Ile Ile Asp Leu Val Lys Lys Tyr Ile	
565 570 575	
ctg gcc ctt tgg aac gaa ggg tac atc atg ggc ttt atc agt aag gag	2016
Leu Ala Leu Trp Asn Glu Gly Tyr Ile Met Gly Phe Ile Ser Lys Glu	
580 585 590	
cgg gag cgg gcc atc ttg agc act aag cct cca ggc acc ttc ctg cta	2064
Arg Glu Arg Ala Ile Leu Ser Thr Lys Pro Pro Gly Thr Phe Leu Leu	
595 600 605	
aga ttc agt gaa agc agc aaa gaa gga ggc gtc act ttc act tgg gtg	2112
Arg Phe Ser Glu Ser Ser Lys Glu Gly Gly Val Thr Phe Thr Trp Val	
610 615 620	
gag aag gac atc agc ggt aag acc cag atc cag tcc gtg gaa cca tac	2160
Glu Lys Asp Ile Ser Gly Lys Thr Gln Ile Gln Ser Val Glu Pro Tyr	
625 630 635 640	
aca aag cag cag ctg aac aac atg tca ttt gct gaa atc atc atg ggc	2208
Thr Lys Gln Gln Leu Asn Asn Met Ser Phe Ala Glu Ile Ile Met Gly	
645 650 655	
tat aag atc atg gat gct acc aat atc ctg gtg tct cca ctg gtc tat	2256
Tyr Lys Ile Met Asp Ala Thr Asn Ile Leu Val Ser Pro Leu Val Tyr	
660 665 670	
ctc tat cct gac att ccc aag gag gag gca ttc gga aag tat tgt cgg	2304
Leu Tyr Pro Asp Ile Pro Lys Glu Glu Ala Phe Gly Lys Tyr Cys Arg	
675 680 685	

cca gag agc cag gag cat cct gaa gct gac cca ggt agc gct gcc cca	2352
Pro Glu Ser Gln Glu His Pro Glu Ala Asp Pro Gly Ser Ala Ala Pro	
690 695 700	
tac ctg aag acc aag ttt atc tgt gtg aca cca acg acc tgc agc aat	2400
Tyr Leu Lys Thr Lys Phe Ile Cys Val Thr Pro Thr Thr Cys Ser Asn	
705 710 715 720	
acc att gac ctg ccg atg tcc ccc cgc act tta gat tca ttg atg cag	2448
Thr Ile Asp Leu Pro Met Ser Pro Arg Thr Leu Asp Ser Leu Met Gln	
725 730 735	
ttt gga aat aat ggt gaa ggt gct gaa ccc tca gca gga ggg cag ttt	2496
Phe Gly Asn Asn Gly Glu Gly Ala Glu Pro Ser Ala Gly Gly Gln Phe	
740 745 750	
gag tcc ctc acc ttt gac atg gag ttg acc tcg gag tgc gct acc tcc	2544
Glu Ser Leu Thr Phe Asp Met Glu Leu Thr Ser Glu Cys Ala Thr Ser	
755 760 765	
ccc atg tga ggagctgaga acggaagctg cagaaagata cgactgaggc	2593
Pro Met *	
770	
gcctacctgc attctgccac ccctcacaca gccaaacccc agatcatctg aaactactaa	2653
ctttgtggtt ccagattttt tttaatctcc tactttctgct atctttgagc aatctgggca	2713
cttttaaaaa tagagaaatg agtgaatgtg ggtgatctgc ttttatctaa atgcaaataa	2773
ggatgtgttc tctgagaccc atgatcaggg gatgtggcgg ggggtggcta gagggagaaa	2833
aaggaaatgt cttgtgttgt tttgttcccc tgccctcctt tctcagcagc tttttgttat	2893
tgttgttgtt gttcttagac aagtgcctcc tgggtgcctgc ggcacccctc tgccgtgttc	2953
tgtaagcaaa tgccacaggc cacctatagc tacatactcc tggcattgca ctttttaacc	3013
ttgctgacat ccaaatagaa gataggacta tctaagccct aggtttcttt ttaaattaag	3073
aaataataac aattaaaggc caaaaaacac tgtatcagca tagcctttct gtatttaaga	3133
aacttaagca gccgggcatg gtggctcacg cctgtaatcc cagcactttg ggaggccgag	3193
gcggtacata aggtcaggag atcaagacca tcctggctaa cacggtgaaa ccccgctctc	3253
actaaaagta caaaaaatta gctgggtgtg gtgggtggcg cctgtagtcc cagctactcg	3313
ggaggctgag gcaggagaat cgcttgaacc tgagaggcgg aggttgcagt gagccaaaat	3373
tgcaccactg cacactgcac tccatcctgg gcgacagtct gagactctgt ctcaaaaaaa	3433
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	3455

<210> 155

<211> 20

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

10

<400> 155

gtgcgcgcga gcccgaatc 20

<210> 156

15 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

5

<400> 156

acatgccact ttggtgttc ataa 24

<210> 157

10

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15

<223> Cebador para PCR

<400> 157

tcttcgtaga ttgtgctgat agagaac 27

20

<210> 158

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Sonda para PCR

<400> 158

cagtatagcc gcttcctgca agagtcgaa 29

30

<210> 159

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 159
agcctctgca ccctcatgtt 20

5

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

10

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 160

15 ctcctaaatt aagaacttct 20

<210> 161
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 161

25 ttttgcata tgtaaccact 20

<210> 162
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

35

<400> 162

tattgaaaat tatctaattc 20

<210> 163
<211> 20

5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

10

<400> 163
ttgggccatc ctgctaaaat 20
<210> 164
<211> 20

15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

20

<400> 164
attcacttgc ctccttgact 20

<210> 165

25 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

30

<400> 165
atgcccttac tctccgcatc 20

35 <210> 166
<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 166

ctgaacttac cctctgagag 20

10 <210> 167

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 167

aaatgcggac ccaagagttt 20

20 <210> 168

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 168

ctgttcct cggtgcgac 20

30 <210> 169

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 169
gcctgtccag gatccggtg 20

5 <210> 170
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 170
gaagggcctc tccgagccga 20

15 <210> 171
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 171

25 ggcggcgagg ctccctcagg 20
<210> 172
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 172

35 tccggcagag gccgagaggc 20

<210> 173
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 173
 10 ccatacctgct aaaatcaggg 20

 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 174
 ccattgggcc atcctgctaa 20

 <210> 175
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 30
 <400> 175
 tgtcaagctg ctgtagctga 20
 <210> 176
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 176

aactgccgca gctccattgg 20

<210> 177

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 177

tcttgactct caatccaagg 20

<210> 178

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 178

cgcataatgcc caatcttgac 20

<210> 179

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 179
 cgactcttgc aggaagcggc 20
 <210> 180
 <211> 20
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 10
 <400> 180
 tcgtagattg tgctgataga 20

 <210> 181
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 181
 agaaactgct tgattctcg 20

 25 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 182
 gatacctgct ctgaagaaac 20
 35
 <210> 183

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 183

ttctcaagat acctgctctg 20

10 <210> 184

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 184

ttggctctc aagatacctg 20

20

<210> 185

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 185

30 gtgattctc ccacaggcac 20

<210> 186

<211> 20

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 186

5 atctgctgct tctccgtcac 20

<210> 187

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 187

15 ccagcatctg ctgcttctcc 20

<210> 188

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 188

25 tgaaggtgct gctccagcat 20

<210> 189

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 189

ttctgttcta gatcctgcac 20

<210> 190
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 190
 ctggagattc tctaccactt 20

 <210> 191
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 191
 aagtcacctt ggagattctc 20
 <210> 192
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 30
 <400> 192
 aatcaaagtc atcctggaga 20

 <210> 193
 35 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5

<400> 193

gttgaaatca aagtcacct 20

<210> 194

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 194

ttatagttga aatcaaagtc 20

20 <210> 195

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 195

gggttttata gttgaaatca 20

30 <210> 196

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 196

cttgaggggtt ttatagttga 20

5 <210> 197

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 197

tgactcttga gggttttata 20

15

<210> 198

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 198

25 ctccttgact cttgaggggtt 20

<210> 199

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 199

catgtctcct tgactcttga 20

<210> 200
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 200
 10 attcagatct tgcattgtctc 20

 <210> 201
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 201
 tgggtgttcc cattcagatc 20

 <210> 202
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 30 <400> 202
 tggtcactga ctggtgtttt 20

 <210> 203
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 203

tccagctgct gcatcttctg 20

<210> 204

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 204

gagcatctgt tccagctgct 20

<210> 205

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 205

cttctccgca tctgggccag 20

<210> 206

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 206

ttctgcacgt actccatcgc 20

<210> 207

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 207

cagccagctc ctcgtccgtg 20

<210> 208

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 208

ctctccagt cagccagctc 20

<210> 209

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 209

tgccgcctct tccagtcagc 20

35 <210> 210

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 210

ccagttttct agccgatcta 20

10 <210> 211

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 211

acgttatcca gtttctagc 20

20 <210> 212

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 212

agttgagatt ctgctaata 20

30

<210> 213

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 213
tctgaagttg agattctgct 20

5

<210> 214
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 214

15 cctttgtagg aaacttttg 20

<210> 215
<211> 20
<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 215
aggcactttt cattaagttt 20

<210> 216
<211> 20
<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 216
ttgaccagca acctgacttt 20

<210> 217
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 217
 agctgataat tcaactcagg 20
 <210> 218
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 218
 ttttaagctg ataattcaac 20

 <210> 219
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 30 <400> 219
 cttaatttt aagctgataa 20
 <210> 220
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 220

gcacacttta attttaagct 20

<210> 221

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15

<400> 221

tcaatgcaca cttaatttt 20

<210> 222

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 222

cccagaatgt taaatttccg 20

30 <210> 223

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 223
agaggctgcc gttgttgat 20
<210> 224
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
10 <223> Oligonucleótido Antisentido
<400> 224
aagtgttga attctgcaga 20
15 <210> 225
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido
<400> 225
tctctgctcc ctcagggtca 20
25 <210> 226
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido
<400> 226
35 atcagggtgca gctcctcagt 20

<210> 227
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 227
 10 aggtgatcag gtgcagctcc 20
 <210> 228
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 228
 20 ctcaaagggtg atcagggtgca 20

 <210> 229
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 30 <400> 229
 gaggccttgg tgatacacct 20

 <210> 230
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 230

tcaatcttga ggccttggtg 20

<210> 231

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15

<400> 231

ctagggtcaat ctgaggcct 20

<210> 232

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 232

ggtctctagg tcaatcttga 20

<210> 233

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35

<400> 233

aaggagtggg tctctaggtc 20

<210> 234
<211> 20

5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

10

<400> 234
ctggcaagga gtgggtctct 20

<210> 235

15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 235
accacaactg gcaaggagtg 20

<210> 236

25 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
30 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 236
tctgacagat gttggagatc 20

35 <210> 237
<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 237
 tggcatctga cagatgttgg 20

10 <210> 238
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 238
 gcatttggca tctgacagat 20

20 <210> 239
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 239
 30 ttcttgggat tgttggtcag 20
 <210> 240
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 240

gtcagctgct cgatgctcag 20

5

<210> 241

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 241

15 tccaagagt ttcttgcca 20

<210> 242

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 242

25 catgtgatct gacaccctga 20

<210> 243

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 243

35 tagcccatgt gatctgacac 20

<210> 244
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 244
 10 gccatgtttt cttgcaaaa 20

 <210> 245
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 245
 ccttgccagc catgttttct 20

 <210> 246
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 30
 <400> 246
 gaagcccttg ccagccatgt 20

 <210> 247
 35 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5

<400> 247

aaggagaagc cctgccagc 20

<210> 248

<211> 20

10

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15

<400> 248

cccagaagga gaagccctg 20

<210> 249

<211> 20

20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 249

tccagccaga cccagaagga 20

<210> 250

30

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 250

tctttgctgc tttcactgaa 20

<210> 251

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 251

atgttggtca gctgctgctt 20

<210> 252

15 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 252

atgacatggt gttcagctgc 20

25 <210> 253

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 253

agcaaatgac atgttggtca 20

35

<210> 254

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 254

atttcagcaa atgacatgtt 20

10

<210> 255

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 255

20 tgatgatttc agcaaatgac 20

<210> 256

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 256

ttatagccca tgatgatttc 20

30

<210> 257

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 257

tgatcttata gcccatgatg 20

5

<210> 258

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 258

15 atccatgatc ttatagcca 20

<210> 259

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 259

ggtagcatcc atgatcttat 20

<210> 260

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35

<400> 260

	aatgtcagga tagagataga	20
	<210> 261	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 261	
10	gcctcctcct tgggaatgc	20
	<210> 262	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
20	<400> 262	
	tccgaatgcc tcctccttgg	20
	<210> 263	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
30	<400> 263	
	tactttccga atgcctcctc	20
	<210> 264	
35	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
5	<400> 264	
	gacaataactt tccgaatgcc	20
	<210> 265	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
15	<400> 265	
	ctacctgggt cagcttcagg	20
	<210> 266	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 266	
	ataaacttgg tcttcaggta	20
	<210> 267	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
35	<223> Oligonucleótido Antisentido	

	<400> 267	
	gtcgttggtg tcacacagat	20
5	<210> 268	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 268	
	tgcaggtcgt tgggtcaca	20
15	<210> 269	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 269	
25	attgctgcag gtcgttggtg	20
	<210> 270	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
35	<400> 270	
	atggattgc tgcaggtcgt	20

<210> 271
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 271
 ggtcaatggt attgctgcag 20

 <210> 272
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 272
 gacatcggca ggtcaatggt 20

 <210> 273
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 273
 caatgaatct aaagtgcggg 20

 35 <210> 274
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 274
 tgcacatgaatg aatctaaagt 20

 10 <210> 275
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 275
 caaactgcat caatgaatct 20
 20
 <210> 276
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 276
 30 atttccaaac tgcacatgaatg 20

 <210> 277
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 277

5 aactgccctc ctgctgaggg 20

<210> 278

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 278

ggtgagggac tcaaactgcc 20

<210> 279

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 279

cagtcgtatc ttctgcagc 20

<210> 280

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 280

agatagcaga agtaggagat 20

5 <210> 281

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 281

15 aaagtgccca gattgctcaa 20

<210> 282

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 282

25 tttttaaag tgcccagatt 20

<210> 283

<211> 20

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 283

cagatcaccc acattcactc 20

<210> 284
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 284
 tgcatttaga taaaagcaga 20

 <210> 285
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 285
 gaacacatcc ttattgcat 20

 <210> 286
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 286
 atcatgggtc tcagagaaca 20

 35 <210> 287
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 287
 cacatcccct gatcatgggt 20

10 <210> 288
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 288
 agacatttcc ttttctccc 20

20 <210> 289
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 289
 30 accaggaggc acttgtctaa 20

<210> 290
 <211> 20
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 290

5 gcaggcacca ggaggcactt 20

<210> 291

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 291

gcttacagaa acaggcagaa 20

<210> 292

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 292

aggtggcctg tggcattgc 20

<210> 293

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 293
gtatgtagct ataggtggcc 20

<210> 294
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 294
gcaatgccag gagtatgtag 20

15 <210> 295
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 295
ttaaaaagtg caatgccagg 20

25 <210> 296
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 296
35 ggcttagata gtcctatctt 20

<210> 297
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 297
 10 taaaaagaaa ctagggctt 20

 <210> 298
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 298
 atacagaaag gctatgctga 20

 <210> 299
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 30
 <400> 299
 ttaagtttct taaatacaga 20

 <210> 300
 35 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5

<400> 300

gcatctgctg cttctccgtc 20

<210> 301

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 301

cagcatctgc tgcttctccg 20

20 <210> 302

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 302

tccagcatct gctgcttctc 20

30

<210> 303

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 303

ctccagcatc tgctgcttct 20

5

<210> 304

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 304

15 tgctccagca tctgctgctt 20

<210> 305

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 305

tgctgctcca gcatctgctg 20

<210> 306

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35

<400> 306

	ggtgctgctc cagcatctgc	20
	<210> 307	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
10		
	<400> 307	
	aagggtgctgc tccagcatct	20
	<210> 308	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 308	
	tgggattggt ggtcagcatg	20
	<210> 309	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 309	
	attcttggga ttgttggtca	20
35	<210> 310	
	<211> 20	

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 310
 acattcttgg gattgttgg 20

 10 <210> 311
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 311
 cacattcttg ggattgttg 20
 20
 <210> 312
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 312
 30 ttcacattct tgggattgtt 20

 <210> 313
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>

	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 313	
5	agttcacatt cttgggattg	20
	<210> 314	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 314	
15	gaagttcaca ttctgggat	20
	<210> 315	
	<211> 20	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 315	
25	agattatgaa acaccaaagt	20
	<210> 316	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 316	
35	ggagattatg aaacaccaa	20

	<210> 317	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
10	<400> 317	
	caggagatta tgaaacacca	20
	<210> 318	
	<211> 20	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
20	<400> 318	
	tcccaggaga ttatgaaaca	20
	<210> 319	
25	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 319	
	ctcccaggag attatgaaac	20
35	<210> 320	
	<211> 20	

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 320
 ctctcccagg agattatgaa 20

10 <210> 321
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 321
 atctctccca ggagattatg 20

20 <210> 322
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 322
 30 cttgccagcc atgttttctt 20

<210> 323
 <211> 20
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 323

5 cccttgccag ccatgtttc 20

<210> 324

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 324

agcccttgcc agccatgtt 20

<210> 325

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 325

gagaagccct tgccagccat 20

<210> 326

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 326
aggagaagcc cttgccagcc 20

<210> 327
5 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 327
gaaggagaag cccttgccag 20

15 <210> 328
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 328
aagcccttgc cagccatgtt 20

25 <210> 329
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 329
35 agaagccctt gccagccatg 20

<210> 330

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 330

10 agaaggagaa gcccttgcca 20

<210> 331

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 331

20 ccagaaggag aagcccttgc 20

<210> 332

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

30 <400> 332

accagaagg agaagccctt 20

<210> 333

<211> 20

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 333
tgccctcctcc ttgggaatgt 20

<210> 334

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15
<400> 334
aatgcctcct ccttggaat 20

<210> 335

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25
<400> 335
cgaatgcctc ctccttgga 20

<210> 336

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35
<400> 336

	ttccgaatgc ctcctccttg	20
	<210> 337	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
10		
	<400> 337	
	ttccgaatg cctcctcctt	20
	<210> 338	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 338	
	actttccgaa tgctcctcc	20
25	<210> 339	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 339	
	ttgcaggaag cggctatact	20
35		
	<210> 340	

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 340

tcttgaggga agcggctata 20

10

<210> 341

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 341

20 actcttgag gaagcggcta 20

<210> 342

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

30 <400> 342

gactcttgca ggaagcggct 20

<210> 343

<211> 20

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 343

tcgactcttg caggaagcgg 20

<210> 344

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15

<400> 344

ttcgactctt gcaggaagcg 20

<210> 345

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 345

cattcgactc tgcaggaag 20

30 <210> 346

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

	<400> 346	
	tcttatagcc catgatgatt	20
5	<210> 347	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 347	
	gatcttatag cccatgatga	20
15	<210> 348	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 348	
25	atgatcttat agcccatgat	20
	<210> 349	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
35	<400> 349	
	ccatgatctt atagcccatg	20

<210> 350
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 350
 gcatccatga tcttagcc 20

 <210> 351
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 351
 tagcatccat gatcttag 20

 <210> 352
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 352
 gtagcatcca tgatctata 20
 <210> 353
 35 <211> 20
 <212> ADN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
5	<400> 353	
	aaaggctatg ctgatacagt	20
	<210> 354	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 354	
	agaaaggcta tgctgataca	20
	<210> 355	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 355	
	acagaaaggc tatgctgata	20
30	<210> 356	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	

	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 356	
5	tacagaaagg ctatgctgat	20
	<210> 357	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 357	
15	aatacagaaa ggctatgctg	20
	<210> 358	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 358	
25	aaatacagaa aggctatgct	20
	<210> 359	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
35	<400> 359	
	ttaaatacag aaaggctatg	20

<210> 360
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 <400> 360
 10 tcttaaatac agaaaggcta 20

 <210> 361
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 361
 ggtctcagag aacacatcct 20

 <210> 362
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 30
 <400> 362
 tgggtctcag agaacacatc 20

 <210> 363
 35 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5

<400> 363

catgggtctc agagaacaca 20

<210> 364

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 364

tcatgggtct cagagaacac 20

<210> 365

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 365

tgatcatggg tctcagagaa 20

30

<210> 366

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 366
cctgatcatg ggtctcagag 20
5

<210> 367
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 367
15 cccctgatca tgggtctcag 20

<210> 368
<211> 20
<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 368
cagacccaga aggagaagcc 20

<210> 369
<211> 20

30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 369

	cagccagacc cagaaggaga	20
	<210> 370	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
10		
	<400> 370	
	ccagccagac ccagaaggag	20
	<210> 371	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 371	
	gtccagccag acccagaagg	20
25	<210> 372	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 372	
	tgtccagcca gaccagaag	20
35		
	<210> 373	

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 373
 attgtccagc cagaccaga 20

10 <210> 374
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 374
 20 atattgtcca gccagacca 20
 <210> 375
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 375
 30 catgatctta tagcccatga 20

<210> 376
 <211> 20
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 376

tccatgatct tatagcccat 20

5

<210> 377

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 377

15 catccatgat cttatagccc 20

<210> 378

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 378

agcatccatg atcttatagc 20

<210> 379

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 379

tggtagcatc catgatctta 20

<210> 380
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 380
 ttggtagcat ccatgatctt 20

 <210> 381
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 381
 gatattggta gcatccatga 20
 <210> 382
 <211> 2924
 25 <212> ADN
 <213> M. musculus

 <220>
 <221> CDS
 30 <222> (173)...(2341)
 <400> 382

```

gtcgacccac gcgtccgcgc tgaggtacaa ccccgctcgg tgtcgctga ccgcgtcggc 60
taggagaggc caggcggccc tcgggagccc agcagctcgc gcctggagtc agcgcaggcc 120
ggccagtcgg gcctcagccc cggagacagt cgagaccct gactgcagca gg atg gct 178
                                         Met Ala
                                         1

cag tgg aac cag ctg cag cag ctg gac aca cgc tac ctg gag cag ctg 226
Gln Trp Asn Gln Leu Gln Gln Leu Asp Thr Arg Tyr Leu Glu Gln Leu
      5              10              15

cac cag ctg tac agc gac acg ttc ccc atg gag ctg cgg cag ttc ctg 274
His Gln Leu Tyr Ser Asp Thr Phe Pro Met Glu Leu Arg Gln Phe Leu
      20              25              30

gca cct tgg att gag agt caa gac tgg gca tat gca gcc agc aaa gag 322
Ala Pro Trp Ile Glu Ser Gln Asp Trp Ala Tyr Ala Ala Ser Lys Glu
      35              40              45              50

tca cat gcc acg ttg gtg ttt cat aat ctc ttg ggt gaa att gac cag 370
Ser His Ala Thr Leu Val Phe His Asn Leu Leu Gly Glu Ile Asp Gln
      55              60              65

caa tat agc cga ttc ctg caa gag tcc aat gtc ctc tat cag cac aac 418
Gln Tyr Ser Arg Phe Leu Gln Glu Ser Asn Val Leu Tyr Gln His Asn
      70              75              80

ctt cga aga atc aag cag ttt ctg cag agc agg tat ctt gag aag cca 466
Leu Arg Arg Ile Lys Gln Phe Leu Gln Ser Arg Tyr Leu Glu Lys Pro
      85              90              95

atg gaa att gcc cgg atc gtg gcc cga tgc ctg tgg gaa gag tct cgc 514
Met Glu Ile Ala Arg Ile Val Ala Arg Cys Leu Trp Glu Glu Ser Arg
      100              105              110

ctc ctc cag acg gca gcc acg gca gcc cag caa ggg ggc cag gcc aac 562
Leu Leu Gln Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gln Gln Gly Gly Gln Ala Asn
      115              120              125              130

cac cca aca gcc gcc gta gtg aca gag aag cag cag atg ttg gag cag 610
His Pro Thr Ala Ala Val Val Thr Glu Lys Gln Gln Met Leu Glu Gln
      135              140              145

cat ctt cag gat gtc cgg aag cga gtg cag gat cta gaa cag aaa atg 658
His Leu Gln Asp Val Arg Lys Arg Val Gln Asp Leu Glu Gln Lys Met
      150              155              160

aag gtg gtg gag aac ctc cag gac gac ttt gat ttc aac tac aaa acc 706
Lys Val Val Glu Asn Leu Gln Asp Asp Phe Asp Phe Asn Tyr Lys Thr
      165              170              175

ctc aag agc caa gga gac atg cag gat ctg aat gga aac aac cag tct 754
Leu Lys Ser Gln Gly Asp Met Gln Asp Leu Asn Gly Asn Asn Gln Ser
      180              185              190

```

gtg acc aga cag aag atg cag cag ctg gaa cag atg ctc aca gcc ctg	802
Val Thr Arg Gln Lys Met Gln Gln Leu Glu Gln Met Leu Thr Ala Leu	
195 200 205 210	
gac cag atg cgg aga agc att gtg agt gag ctg gcg ggg ctc ttg tca	850
Asp Gln Met Arg Arg Ser Ile Val Ser Glu Leu Ala Gly Leu Leu Ser	
215 220 225	
gca atg gag tac gtg cag aag aca ctg act gat gaa gag ctg gct gac	898
Ala Met Glu Tyr Val Gln Lys Thr Leu Thr Asp Glu Glu Leu Ala Asp	
230 235 240	
tgg aag agg cgg cag cag atc gcg tgc atc gga ggc cct ccc aac atc	946
Trp Lys Arg Arg Gln Gln Ile Ala Cys Ile Gly Gly Pro Pro Asn Ile	
245 250 255	
tgc ctg gac cgt ctg gaa aac tgg ata act tca tta gca gaa tct caa	994
Cys Leu Asp Arg Leu Glu Asn Trp Ile Thr Ser Leu Ala Glu Ser Gln	
260 265 270	
ctt cag acc cgc caa caa att aag aaa ctg gag gag ctg cag cag aaa	1042
Leu Gln Thr Arg Gln Gln Ile Lys Lys Leu Glu Glu Leu Gln Gln Lys	
275 280 285 290	
gtg tcc tac aag ggc gac cct atc gtg cag cac cgg ccc atg ctg gag	1090
Val Ser Tyr Lys Gly Asp Pro Ile Val Gln His Arg Pro Met Leu Glu	
295 300 305	
gag agg atc gtg gag ctg ttc aga aac tta atg aag agt gcc ttc gtg	1138
Glu Arg Ile Val Glu Leu Phe Arg Asn Leu Met Lys Ser Ala Phe Val	
310 315 320	
gtg gag cgg cag ccc tgc atg ccc atg cac ccg gac cgg ccc tta gtc	1186
Val Glu Arg Gln Pro Cys Met Pro Met His Pro Asp Arg Pro Leu Val	
325 330 335	
atc aag act ggt gtc cag ttt acc acg aaa gtc agg ttg ctg gtc aaa	1234
Ile Lys Thr Gly Val Gln Phe Thr Thr Lys Val Arg Leu Leu Val Lys	
340 345 350	
ttt cct gag ttg aat tat cag ctt aaa att aaa gtg tgc att gat aaa	1282
Phe Pro Glu Leu Asn Tyr Gln Leu Lys Ile Lys Val Cys Ile Asp Lys	
355 360 365 370	
gac tct ggg gat gtt gct gcc ctc aga ggg tct cgg aaa ttt aac att	1330
Asp Ser Gly Asp Val Ala Ala Leu Arg Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ile	
375 380 385	
ctg ggc acg aac aca aaa gtg atg aac atg gag gag tct aac aac ggc	1378
Leu Gly Thr Asn Thr Lys Val Met Asn Met Glu Glu Ser Asn Asn Gly	
390 395 400	
agc ctg tct gca gag ttc aag cac ctg acc ctt agg gag cag aga tgt	1426
Ser Leu Ser Ala Glu Phe Lys His Leu Thr Leu Arg Glu Gln Arg Cys	
405 410 415	
ggg aat gga ggc cgt gcc aat tgt gat gcc tcc ttg atc gtg act gag	1474
Gly Asn Gly Gly Arg Ala Asn Cys Asp Ala Ser Leu Ile Val Thr Glu	
420 425 430	
gag ctg cac ctg atc acc ttc gag act gag gtg tac cac caa ggc ctc	1522
Glu Leu His Leu Ile Thr Phe Glu Thr Glu Val Tyr His Gln Gly Leu	
435 440 445 450	

aag att gac cta gag acc cac tcc ttg cca gtt gtg gtg atc tcc aac	1570
Lys Ile Asp Leu Glu Thr His Ser Leu Pro Val Val Val Ile Ser Asn	
455 460 465	
atc tgt cag atg cca aat gct tgg gca tca atc ctg tgg tat aac atg	1618
Ile Cys Gln Met Pro Asn Ala Trp Ala Ser Ile Leu Trp Tyr Asn Met	
470 475 480	
ctg acc aat aac ccc aag aac gtg aac ttc ttc act aag ccg cca att	1666
Leu Thr Asn Asn Pro Lys Asn Val Asn Phe Phe Thr Lys Pro Pro Ile	
485 490 495	
gga acc tgg gac caa gtg gcc gag gtg ctc agc tgg cag ttc tcg tcc	1714
Gly Thr Trp Asp Gln Val Ala Glu Val Leu Ser Trp Gln Phe Ser Ser	
500 505 510	
acc acc aag cga ggg ctg agc atc gag cag ctg aca acg ctg gct gag	1762
Thr Thr Lys Arg Gly Leu Ser Ile Glu Gln Leu Thr Thr Leu Ala Glu	
515 520 525 530	
aag ctc cta ggg cct ggt gtg aac tac tca ggg tgt cag atc aca tgg	1810
Lys Leu Leu Gly Pro Gly Val Asn Tyr Ser Gly Cys Gln Ile Thr Trp	
535 540 545	
gct aaa ttc tgc aaa gaa aac atg gct ggc aag ggc ttc tcc ttc tgg	1858
Ala Lys Phe Cys Lys Glu Asn Met Ala Gly Lys Gly Phe Ser Phe Trp	
550 555 560	
gtc tgg cta gac aat atc atc gac ctt gtg aaa aag tat atc ttg gcc	1906
Val Trp Leu Asp Asn Ile Ile Asp Leu Val Lys Lys Tyr Ile Leu Ala	
565 570 575	
ctt tgg aat gaa ggg tac atc atg ggt ttc atc agc aag gag cgg gag	1954
Leu Trp Asn Glu Gly Tyr Ile Met Gly Phe Ile Ser Lys Glu Arg Glu	
580 585 590	
cgg gcc atc cta agc aca aag ccc ccg ggc acc ttc cta ctg cgc ttc	2002
Arg Ala Ile Leu Ser Thr Lys Pro Pro Gly Thr Phe Leu Leu Arg Phe	
595 600 605 610	
agc gag agc agc aaa gaa gga ggg gtc act ttc act tgg gtg gaa aag	2050
Ser Glu Ser Ser Lys Glu Gly Gly Val Thr Phe Thr Trp Val Glu Lys	
615 620 625	
gac atc agt ggc aag acc cag atc cag tct gta gag cca tac acc aag	2098
Asp Ile Ser Gly Lys Thr Gln Ile Gln Ser Val Glu Pro Tyr Thr Lys	
630 635 640	
cag cag ctg aac aac atg tca ttt gct gaa atc atc atg ggc tat aag	2146
Gln Gln Leu Asn Asn Met Ser Phe Ala Glu Ile Ile Met Gly Tyr Lys	
645 650 655	
atc atg gat gcg acc aac atc ctg gtg tct cca ctt gtc tac ctc tac	2194
Ile Met Asp Ala Thr Asn Ile Leu Val Ser Pro Leu Val Tyr Leu Tyr	
660 665 670	
ccc gac att ccc aag gag gag gca ttt gga aag tac tgt agg ccc gag	2242
Pro Asp Ile Pro Lys Glu Glu Ala Phe Gly Lys Tyr Cys Arg Pro Glu	
675 680 685 690	
agc cag gag cac ccc gaa gcc gac cca ggt agt gct gcc ccg tac ctg	2290
Ser Gln Glu His Pro Glu Ala Asp Pro Gly Ser Ala Ala Pro Tyr Leu	
695 700 705	
aag acc aag ttc atc tgt gtg aca cca ttc att gat gca gtt tgg aaa	2338

Lys Thr Lys Phe Ile Cys Val Thr Pro Phe Ile Asp Ala Val Trp Lys
710 715 720

taa cgggtgaagggt gctgagccct cagcaggagg gcagtttgag tcgctcacgt 2391
*

ttgacatgga tctgacctcg gagtgtgcta cctcccccat gtgaggagct gaaaccagaa 2451
gctgcagaga cgtgacttga gacacctgcc ccgtgctcca cccctaagca gccgaacccc 2511
atatcgtctg aaactcctaa ctttgtgggt ccagattttt ttttttaatt tcctacttct 2571
gctatctttg ggcaatctgg gcacttttta aaagagagaa atgagtgagt gtgggtgata 2631
aactgttatg taaagaggag agcacctctg agtctgggga tggggctgag agcagaaggg 2691
aggcaaaggg gaacacctcc tgtcctgcc gcctgccctc ctttttcagc agctcggggg 2751
ttggttgta gacaagtgcc tcctgggtgcc catggctacc tgttgcccca ctctgtgagc 2811
tgatacccca ttctgggaac tcctggctct gcactttcaa ccttgcta atccacatag 2871
aagctaggac taagcccagg aggttcctct tttaaattaaa aaaaaaaaaa aaa 2924

<210> 383

5 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 383

tggtattgct gcaggtcgtt 20

15 <210> 384

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 384

cggcaggta atggtattgc 20

25

<210> 385

<211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 385
 ggacatcggc aggtcaatgg 20

 10 <210> 386
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 386
 ttgtacctca gcgcggacgc 20
 20
 <210> 387
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 387
 30 aaaagtgtccc agattgtccc 19

 <210> 388
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 388

5 aaaagtgtccc agattgcc 18

<210> 389

<211> 17

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 389

aaagtgtcca gattgcc 17

<210> 390

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 390

gctgcaggtc gttggtgtca 20

<210> 391

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 391
 ttctacctcg cgcgatttac 20

<210> 392
 5 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 392
 gtacagttat gcgcggtaga 20

15 <210> 393
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 393
 ttagaatacg tcgcgttatg 20

25 <210> 394
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 394
 35 cgttattaac ctccgttgaa 20

<210> 395
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 395
 10 ctgctagcct ctggattga 20

 <210> 396
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 396
 ctcttactgt gctgtggaca 20

 <210> 397
 <211> 15
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador para PCR
 30
 <400> 397
 gaggcccgcc caaca 15

 <210> 398
 35 <211> 26
 <212> ADN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador para PCR	
5	<400> 398	
	ttctgctaata gacgttatcc agtttt	26
	<210> 399	
	<211> 14	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda para PCR	
15	<400> 399	
	ctgcctagat cggc	14
	<210> 400	
20	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 400	
	attcttggga ttgttgtct t	21
30	<210> 401	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	

	<400> 401	
	ctccagcatc tgctgcttct t	21
5	<210> 402	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 402	
	tttgatcgag gttagccgtg	20
15	<210> 403	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 403	
	actcaggcta cctttctgct	20
25	<210> 404	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 404	
35	gctccaatac ccgttgcttc	20

<210> 405
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 405
 10 ccgctctgct atagaggcac 20

 <210> 406
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 20 <400> 406
 aaaagtatct aaatcgctca 20

 <210> 407
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 30
 <400> 407
 taaaagcgtc taagttgctc 20

 <210> 408
 35 <211> 20
 <212> ADN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
5	<400> 408	
	aggagaagcc cttgccagcc	20
	<210> 409	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 409	
	ccttcctga aggtcctcc	20
	<210> 410	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 410	
	atgcatacta cgaaaggccg	20
30	<210> 411	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 411

ttcgcggctg gacgattcag 20

5

<210> 412

<211> 4978

<212> ADN

<213> H. sapiens

10

<220>

<221> CDS

<222> (241)...(2553)

15

<400> 412

```

ggtttccgga gctgcggcgg cgcagactgg gagggggagc cgggggttcc gacgtcgcag 60
ccgagggaaac aagccccaac cggatcctgg acaggcaccc cggcttggcg ctgtctctcc 120
ccctcggctc ggagaggccc ttcggcctga gggagcctcg ccgcccgtcc ccggcacacg 180
cgcagccccg gcctctcggc ctctgccgga gaaacagttg ggaccctga ttttagcagg 240
atg gcc caa tgg aat cag cta cag cag ctt gac aca cgg tac ctg gag 288
Met Ala Gln Trp Asn Gln Leu Gln Gln Leu Asp Thr Arg Tyr Leu Glu
1 5 10 15

cag ctc cat cag ctc tac agt gac agc ttc cca atg gag ctg cgg cag 336
Gln Leu His Gln Leu Tyr Ser Asp Ser Phe Pro Met Glu Leu Arg Gln
20 25 30

ttt ctg gcc cct tgg att gag agt caa gat tgg gca tat gcg gcc agc 384
Phe Leu Ala Pro Trp Ile Glu Ser Gln Asp Trp Ala Tyr Ala Ala Ser
35 40 45

aaa gaa tca cat gcc act ttg gtg ttt cat aat ctc ctg gga gag att 432
Lys Glu Ser His Ala Thr Leu Val Phe His Asn Leu Leu Gly Glu Ile
50 55 60

gac cag cag tat agc cgc ttc ctg caa gag tcg aat gtt ctc tat cag 480
Asp Gln Gln Tyr Ser Arg Phe Leu Gln Glu Ser Asn Val Leu Tyr Gln
65 70 75 80

cac aat cta cga aga atc aag cag ttt ctt cag agc agg tat ctt gag 528
His Asn Leu Arg Arg Ile Lys Gln Phe Leu Gln Ser Arg Tyr Leu Glu
85 90 95

aag cca atg gag att gcc cgg att gtg gcc cgg tgc ctg tgg gaa gaa 576
Lys Pro Met Glu Ile Ala Arg Ile Val Ala Arg Cys Leu Trp Glu Glu
100 105 110

tca cgc ctt cta cag act gca gcc act gcg gcc cag caa ggg ggc cag 624
Ser Arg Leu Leu Gln Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gln Gln Gly Gly Gln
115 120 125

gcc aac cac ccc aca gca gcc gtg gtg acg gag aag cag cag atg ctg 672
Ala Asn His Pro Thr Ala Ala Val Val Thr Glu Lys Gln Gln Met Leu
130 135 140

gag cag cac ctt cag gat gtc cgg aag aga gtg cag gat cta gaa cag 720
Glu Gln His Leu Gln Asp Val Arg Lys Arg Val Gln Asp Leu Glu Gln
145 150 155 160

```

aaa atg aaa gtg gta gag aat ctc cag gat gac ttt gat ttc aac tat	768
Lys Met Lys Val Val Glu Asn Leu Gln Asp Asp Phe Asp Phe Asn Tyr	
165 170 175	
aaa acc ctc aag agt caa gga gac atg caa gat ctg aat gga aac aac	816
Lys Thr Leu Lys Ser Gln Gly Asp Met Gln Asp Leu Asn Gly Asn Asn	
180 185 190	
cag tca gtg acc agg cag aag atg cag cag ctg gaa cag atg ctc act	864
Gln Ser Val Thr Arg Gln Lys Met Gln Gln Leu Glu Gln Met Leu Thr	
195 200 205	
gcg ctg gac cag atg cgg aga agc atc gtg agt gag ctg gcg ggg ctt	912
Ala Leu Asp Gln Met Arg Arg Ser Ile Val Ser Glu Leu Ala Gly Leu	
210 215 220	
ttg tca gcg atg gag tac gtg cag aaa act ctc acg gac gag gag ctg	960
Leu Ser Ala Met Glu Tyr Val Gln Lys Thr Leu Thr Asp Glu Glu Leu	
225 230 235 240	
gct gac tgg aag agg cgg caa cag att gcc tgc att gga ggc ccg ccc	1008
Ala Asp Trp Lys Arg Arg Gln Gln Ile Ala Cys Ile Gly Gly Pro Pro	
245 250 255	
aac atc tgc cta gat cgg cta gaa aac tgg ata acg tca tta gca gaa	1056
Asn Ile Cys Leu Asp Arg Leu Glu Asn Trp Ile Thr Ser Leu Ala Glu	
260 265 270	
tct caa ctt cag acc cgt caa caa att aag aaa ctg gag gag ttg cag	1104
Ser Gln Leu Gln Thr Arg Gln Gln Ile Lys Lys Leu Glu Glu Leu Gln	
275 280 285	
caa aaa gtt tcc tac aaa ggg gac ccc att gta cag cac cgg ccg atg	1152
Gln Lys Val Ser Tyr Lys Gly Asp Pro Ile Val Gln His Arg Pro Met	
290 295 300	
ctg gag gag aga atc gtg gag ctg ttt aga aac tta atg aaa agt gcc	1200
Leu Glu Glu Arg Ile Val Glu Leu Phe Arg Asn Leu Met Lys Ser Ala	
305 310 315 320	
ttt gtg gtg gag cgg cag ccc tgc atg ccc atg cat cct gac cgg ccc	1248
Phe Val Val Glu Arg Gln Pro Cys Met Pro Met His Pro Asp Arg Pro	
325 330 335	
ctc gtc atc aag acc ggc gtc cag ttc act act aaa gtc agg ttg ctg	1296
Leu Val Ile Lys Thr Gly Val Gln Phe Thr Thr Lys Val Arg Leu Leu	
340 345 350	
gtc aaa ttc cct gag ttg aat tat cag ctt aaa att aaa gtg tgc att	1344
Val Lys Phe Pro Glu Leu Asn Tyr Gln Leu Lys Ile Lys Val Cys Ile	
355 360 365	
gac aaa gac tct ggg gac gtt gca gct ctc aga gga tcc cgg aaa ttt	1392
Asp Lys Asp Ser Gly Asp Val Ala Ala Leu Arg Gly Ser Arg Lys Phe	
370 375 380	
aac att ctg ggc aca aac aca aaa gtg atg aac atg gaa gaa tcc aac	1440
Asn Ile Leu Gly Thr Asn Thr Lys Val Met Asn Met Glu Glu Ser Asn	
385 390 395 400	
aac ggc agc ctc tct gca gaa ttc aaa cac ttg acc ctg agg gag cag	1488
Asn Gly Ser Leu Ser Ala Glu Phe Lys His Leu Thr Leu Arg Glu Gln	
405 410 415	

aga tgt ggg aat ggg ggc cga gcc aat tgt gat gct tcc ctg att gtg	1536
Arg Cys Gly Asn Gly Gly Arg Ala Asn Cys Asp Ala Ser Leu Ile Val	
420 425 430	
act gag gag ctg cac ctg atc acc ttt gag acc gag gtg tat cac caa	1584
Thr Glu Glu Leu His Leu Ile Thr Phe Glu Thr Glu Val Tyr His Gln	
435 440 445	
ggc ctc aag att gac cta gag acc cac tcc ttg cca gtt gtg gtg atc	1632
Gly Leu Lys Ile Asp Leu Glu Thr His Ser Leu Pro Val Val Val Ile	
450 455 460	
tcc aac atc tgt cag atg cca aat gcc tgg gcg tcc atc ctg tgg tac	1680
Ser Asn Ile Cys Gln Met Pro Asn Ala Trp Ala Ser Ile Leu Trp Tyr	
465 470 475 480	
aac atg ctg acc aac aat ccc aag aat gta aac ttt ttt acc aag ccc	1728
Asn Met Leu Thr Asn Asn Pro Lys Asn Val Asn Phe Phe Thr Lys Pro	
485 490 495	
cca att gga acc tgg gat caa gtg gcc gag gtc ctg agc tgg cag ttc	1776
Pro Ile Gly Thr Trp Asp Gln Val Ala Glu Val Leu Ser Trp Gln Phe	
500 505 510	
tcc tcc acc acc aag cga gga ctg agc atc gag cag ctg act aca ctg	1824
Ser Ser Thr Thr Lys Arg Gly Leu Ser Ile Glu Gln Leu Thr Thr Leu	
515 520 525	
gca gag aaa ctc ttg gga cct ggt gtg aat tat tca ggg tgt cag atc	1872
Ala Glu Lys Leu Leu Gly Pro Gly Val Asn Tyr Ser Gly Cys Gln Ile	
530 535 540	
aca tgg gct aaa ttt tgc aaa gaa aac atg gct ggc aag ggc ttc tcc	1920
Thr Trp Ala Lys Phe Cys Lys Glu Asn Met Ala Gly Lys Gly Phe Ser	
545 550 555 560	
ttc tgg gtc tgg ctg gac aat atc att gac ctt gtg aaa aag tac atc	1968
Phe Trp Val Trp Leu Asp Asn Ile Ile Asp Leu Val Lys Lys Tyr Ile	
565 570 575	
ctg gcc ctt tgg aac gaa ggg tac atc atg ggc ttt atc agt aag gag	2016
Leu Ala Leu Trp Asn Glu Gly Tyr Ile Met Gly Phe Ile Ser Lys Glu	
580 585 590	
cgg gag cgg gcc atc ttg agc act aag cct cca ggc acc ttc ctg cta	2064
Arg Glu Arg Ala Ile Leu Ser Thr Lys Pro Pro Gly Thr Phe Leu Leu	
595 600 605	
aga ttc agt gaa agc agc aaa gaa gga ggc gtc act ttc act tgg gtg	2112
Arg Phe Ser Glu Ser Ser Lys Glu Gly Gly Val Thr Phe Thr Trp Val	
610 615 620	
gag aag gac atc agc ggt aag acc cag atc cag tcc gtg gaa cca tac	2160
Glu Lys Asp Ile Ser Gly Lys Thr Gln Ile Gln Ser Val Glu Pro Tyr	
625 630 635 640	
aca aag cag cag ctg aac aac atg tca ttt gct gaa atc atc atg ggc	2208
Thr Lys Gln Gln Leu Asn Asn Met Ser Phe Ala Glu Ile Ile Met Gly	
645 650 655	
tat aag atc atg gat gct acc aat atc ctg gtg tct cca ctg gtc tat	2256
Tyr Lys Ile Met Asp Ala Thr Asn Ile Leu Val Ser Pro Leu Val Tyr	
660 665 670	
ctc tat cct gac att ccc aag gag gag gca ttc gga aag tat tgt cgg	2304

Leu	Tyr	Pro	Asp	Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Ala	Phe	Gly	Lys	Tyr	Cys	Arg	
		675					680					685				
cca	gag	agc	cag	gag	cat	cct	gaa	gct	gac	cca	ggg	agc	gct	gcc	cca	2352
Pro	Glu	Ser	Gln	Glu	His		Pro	Glu	Ala	Asp	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Pro
		690					695					700				
tac	ctg	aag	acc	aag	ttt	atc	tgt	gtg	aca	cca	acg	acc	tgc	agc	aat	2400
Tyr	Leu	Lys	Thr	Lys	Phe	Ile	Cys	Val	Thr	Pro	Thr	Thr	Cys	Ser	Asn	
		705				710				715					720	
acc	att	gac	ctg	ccg	atg	tcc	ccc	cgc	act	tta	gat	tca	ttg	atg	cag	2448
Thr	Ile	Asp	Leu	Pro	Met	Ser	Pro	Arg	Thr	Leu	Asp	Ser	Leu	Met	Gln	
				725					730					735		
ttt	gga	aat	aat	ggg	gaa	ggg	gct	gaa	ccc	tca	gca	gga	ggg	cag	ttt	2496
Phe	Gly	Asn	Asn	Gly	Glu	Gly	Ala	Glu	Pro	Ser	Ala	Gly	Gly	Gln	Phe	
			740					745					750			
gag	tcc	ctc	acc	ttt	gac	atg	gag	ttg	acc	tcg	gag	tgc	gct	acc	tcc	2544
Glu	Ser	Leu	Thr	Phe	Asp	Met	Glu	Leu	Thr	Ser	Glu	Cys	Ala	Thr	Ser	
		755					760					765				
ccc	atg	tga	ggagctgaga	acggaagctg	cagaaagata	cgactgaggc										2593
Pro	Met	*														
		770														
gcctacctgc	attctgccac	ccctcacaca	gccaaacccc	agatcatctg	aaactactaa	2653										
ctttgtggtt	ccagatTTTT	tttaatctcc	tacttctgct	atctttgagc	aatctgggca	2713										
cttttaaaaa	tagagaaatg	agtgaatgtg	ggatgctctg	ttttatctaa	atgcaaataa	2773										
ggatgtgttc	tctgagaccc	atgatcaggg	gatgtggcgg	gggggtggcta	gagggagaaa	2833										
aaggaaatgt	cttgtgttgt	tttgttcccc	tgcctcctt	tctcagcagc	ttttgttat	2893										
tgttgttgtt	gttcttagac	aagtgcctcc	tgggtgcctg	ggcatccttc	tgcctgtttc	2953										
tgttaagcaaa	tgccacaggc	cacatatagc	tacatactcc	tggcattgca	ctttttaacc	3013										
ttgtctgacat	ccaaatagaa	gataggacta	tctaagccct	agggttcttt	ttaaattaag	3073										
aaataataac	aattaaaggg	caaaaaacac	tgtatcagca	tagcctttct	gtatttaaga	3133										
aacttaagca	gcggggcatg	gtggctcacg	cctgtaatcc	cagcactttg	ggaggccgag	3193										
gcggatcata	aggctcaggag	atcaagacca	tcctggctaa	cacgggtgaa	ccccgtctct	3253										
actaaaagta	caaaaaatta	gctgggtgtg	gtgggtggcg	cctgtagtcc	cagctactcg	3313										
ggaggctgag	gcaggagaat	cgcttgaacc	tgagaggcgg	agggtgcagt	gagccaaaat	3373										
tgcaccactg	cacactgcac	tccatcctgg	gcgacagtct	gagactctgt	ctcaaaaaaa	3433										
aaaaaaaaaa	aaagaaactt	cagttaacag	cctccttggt	gctttaagca	ttcagcttcc	3493										
ttcaggctgg	taatttatat	aatccctgaa	acgggcttca	gggtcaaacc	ttaagacatc	3553										
tgaagctgca	acctggcctt	tgggtgtgaa	ataggaaggt	ttaaggagaa	tctaagcatt	3613										
ttagactttt	ttttataaat	agacttatit	tcctttgtaa	tgtattggcc	ttttagttag	3673										
taaggctggg	cagagggtgc	ttacaacctt	gactcccttt	ctccctggac	ttgatctgct	3733										
gtttcagagg	ctaggttgtt	tctgtgggtg	ccttatcagg	gctgggatac	ttctgattct	3793										
ggcttccttc	ctgccccacc	ctcccgaccc	cagtcctcct	gatcctgcta	gaggcatgtc	3853										
tccttgctgt	tctaaaggtc	cctcatcctg	tttgttttag	gaatcctggg	ctcaggacct	3913										
catggaagaa	gagggggaga	gagttacagg	ttggacatga	tgcacactat	ggggccccag	3973										
cgacgtgtct	ggttgagctc	agggaatatg	gttcttagcc	agtttcttgg	tgatatccag	4033										
tggcacttgt	aatggcgtct	tcattcagtt	catgcagggc	aaaggcttac	tgataaactt	4093										
gagtctgccc	tcgtatgagg	gtgtatacct	ggcctccttc	tgaggctggg	gactcctccc	4153										
tgtctggggc	ccacaggtga	ggcagaacag	ctagagggcc	tccccgcctg	cccgcttggg	4213										
ctggctagct	cgctctcctt	gtgcgtatgg	gaacacctag	cacgtgctgg	atgggctgcc	4273										
tctgactcag	aggcatggcc	ggatttggca	actcaaaacc	accttgccctc	agctgatcag	4333										
agtttctgtg	gaattctgtt	tgtaaataca	aattagctgg	tctctgaatt	aagggggaga	4393										
cgaccttctc	taagatgaac	agggttcgcc	ccagtcctcc	tgcctggaga	cagttgatgt	4453										
gtcatgcaga	gctcttactt	ctccagcaac	actcttcagt	acataataag	cttaactgat	4513										
aaacagaata	tttagaaagg	tgagacttgg	gcttaccatt	gggtttaaat	catagggacc	4573										
tagggcgagg	gtctgggctt	tctctggagg	agatatgtgc	aagttcatgg	ccttaggtag	4633										
catgtatctg	gtcttaactc	tgattgtagc	aaaagttctg	agaggagctg	agccctgttg	4693										
tggcccatta	aagaacaggg	tcctcaggcc	ctgcccgttt	cctgtccact	gccccctccc	4753										
catccccagc	ccagccgagg	gaatcccgtg	ggttgcttac	ctacctataa	ggtggtttat	4813										
aagctgctgt	cctggccact	gcattcaaat	tccaatgtgt	acttcatagt	gtaaaaatit	4873										

atattattgt gaggtttttt gtcttttttt tttttttttt ttttttggtat attgctgtat 4933
ctactttaac ttccagaaat aaacgttata taggaaccgt aaaaa 4978

<210> 413

<211> 20

5 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Compuesto oligomérico

10

<400> 413

uuugucucug guccuuacuu 20

<210> 414

15 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Compuesto oligomérico

<400> 414

uuaucgcuuc ucguugcuu 19

25 <210> 415

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 415

tagtgccgac ctaccacga 20

35

<210> 416

	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 416	
10	ccauuggcuu cucaagaua	19
	<210> 417	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 417	
20	gccccgccag cucacucac	19
	<210> 418	
	<211> 19	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
30	<400> 418	
	gaguuuucug cacguacuc	19
	<210> 419	
	<211> 19	
35	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
5	<400> 419	
	ccaguuucuu aauuuguug	19
	<210> 420	
	<211> 19	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
15	<400> 420	
	aaacuuuuug cugcaacuc	19
	<210> 421	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 421	
	uuuaguuucu aaacagcuc	19
30	<210> 422	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	

	<400> 422	
	aaaaaaaagc ugauaauc	19
5	<210> 423	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 423	
	gagucuuugu caaugcaca	19
15	<210> 424	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 424	
25	uuguuggauu cuuccaugu	19
	<210> 425	
	<211> 19	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
35	<400> 425	
	gugggucucu aggucaauc	19

	<210> 426	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
5		
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 426	
10	aacuggcaag gaguggguc	19
	<210> 427	
	<211> 19	
	<212> ARN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
20	<400> 427	
	cugaauaauu cacaccagg	19
	<210> 428	
	<211> 19	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
30	<400> 428	
	auuuagccca ugugaucug	19
	<210> 429	
	<211> 19	
35	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	

<220>

<223> Compuesto oligomérico

5 <400> 429

ucuuugcaaa auuuagccc 19

<210> 430

<211> 19

10 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Compuesto oligomérico

15 <400> 430

cagccauguu uucuuugca 19

<210> 431

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Compuesto oligomérico

25

<400> 431

aggucaauga uauugucca 19

<210> 432

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Compuesto oligomérico

	<400> 432	
	cuuuuucaca aggucaaug	19
	<210> 433	
5	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 433	
	ccaggaugua cuuuuucac	19
	<210> 434	
15	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 434	
	ucacugaauc uuagcagga	19
25	<210> 435	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 435	
35	aaagauagca gaaguagga	19

	<210> 436	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
5		
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 436	
10	uuuggauguc agcaagguu	19
	<210> 437	
	<211> 19	
	<212> ARN	
15	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 437	
20	cccuuuuuuu guuauuuuu	19
	<210> 438	
	<211> 19	
25	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
30		
	<400> 438	
	gggauuuauu aaauuacca	19
	<210> 439	
35	<211> 19	
	<212> ARN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
5	<400> 439	
	aaauaagucu auuuauaaa	19
	<210> 440	
10	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 440	
	ggccaauaca uuacaaagg	19
	<210> 441	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 441	
	uauaccaag aaacuggcu	19
30	<210> 442	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	

	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 442	
5	gacucaaguu uaucaguua	19
	<210> 443	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 443	
15	aaauccacag aaacucuga	19
	<210> 444	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
25	<400> 444	
	uaauuugauu uaacaaaca	19
	<210> 445	
	<211> 19	
30	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
35	<400> 445	

	uauguacuga agaguguug	19
	<210> 446	
	<211> 19	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
10		
	<400> 446	
	ucucaccuuu cuaaauuu	19
	<210> 447	
15	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 447	
	aagaccagau acaugcuac	19
	<210> 448	
25	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 448	
	cuuuugcuac aaucagagu	19
35	<210> 449	
	<211> 19	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 449	
	ccaccuuaua gguagguaa	19
10	<210> 450	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 450	
	gaaguacaca uuggaauuu	19
20	<210> 451	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Compuesto oligomérico	
	<400> 451	
30	uggaaguuaa aguagauac	19
	<210> 452	
	<211> 19	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	

<223> Compuesto oligomérico

<400> 452
uacgguuccu auauaacgu 19

5

<210> 453
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<221> misc_feature

15

<222> 1-20
<223> n = A,T,C o G

<400> 453
nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnn 20

20

<210> 454
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 454

30

gccctccatg ctggcacagg 20
<210> 455
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 455

ccgagctctc ttatcaacag 20

5

<210> 456

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 456

15 gattatcact atggctggcc 20

<210> 457

<220>

20

<400> 457

000

<210> 458

25

<220>

<400> 458

000

30

<210> 459

<220>

35 <400> 459

000

<210> 460

<220>

5

<400> 460

000

<210> 461

10

<211> 51981

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

15

<400> 461

```

actcagctga gttttcagca ggacattccg ctaatgtctc ctccctcccc ccgggctttt 60
ttgtaagcta ggcctctgcg cgtcccttgg tcgcggaggg aggagcacia agctctcaga 120
acagccaact cagggaggtg tgcccagagc tctcgacccc gccttctctc ctagaggcgt 180
ttttcattgg ttagtgggcg gggcttagga agtacagcgc tcgcccggag gcctcagggg 240
ggcctagcca gctggccatt ccttaattat gcatggaggg gtgtcttggc cagtggcggc 300
tgggtgggga ttggctggag gggctgtaat tcagcggttt ccggagctgc agtgtagaca 360
gggaggggga acctggggtt ccgacgtcgc ggcggagggg acgagcccta accggatcgc 420
tgaggtacaa ccccgctcgg tgtcgcctga ccgcgtcggc taggagaggc caggcggccc 480
tcgggagccc agcagctcgc gcctggagtc agcgcaggcc ggccagtcgg gcctcagccc 540
cggagacagg tgaagggggt gcaggggtgg gccacctccc cgacggcacg ggggacggca 600
tgggggaccc cacggttcgt cagctgtggg ggtgcttaga gctgtgaatg gacacttaca 660
tggggcagga ggataggagg agacacacag ggtcgtcccg gcggcactga cgtccggatg 720
acaggaacca gcctgggaaa ggaagggacg ctgtaagttt cgagggggag atgcggagag 780
agagtgggga gttctggggg gtgtaggacc gtggggggga ggacattcta ggctgagggg 840
aacagaactg acagaagcgg ccctcctgtg actgctcccg gaggctaggg acgttcgggc 900
caccagacc actgccactc aggtggagat cattgggggt gaggcgttag aaggagcctc 960
cttcctgcgc ctgtgctggc cctggccgtt ccttgcctag ccactttctt tgccttgctc 1020
ccgttccttc tgtagttagc tgtaccact taggaggtgg gaactgttgt gtctctcctc 1080
ctgcctctcc gcccctcccc ctccccctcc ccccccccc ccagcctctg ggactggcta 1140
gatttttttc ttaagaatca gatttcctat agaaaattga caaacttgta tcctttctaa 1200
attctctccc atctctttct gtgttaagct atgatttccc ccaccttggt aagaacactt 1260
ttttttttcc caattcaaaa taaatccctg gccaaaccag ctctaaagag caacaaacct 1320
ctttcctctt tgacattgtt ctctcataaa cacctggtaa actcgacgag acgataaata 1380
attgagccat tgcatttact ggatcgtggg gttgcttaat tgcacaggcc agggtagacc 1440
aatcaagagt gggagttttc tgtctcatag ccaagctctt gtgtaaaagc agaagctagg 1500
gaaacaaaga caggctggcc ttggctgagt tctgtgtgta aactttacct gttggggggg 1560
gtgtggctat aaattggtaa gttggcaaaa tccagactgt tgctcaagtc acttttttca 1620
tacctggtcc acatccctcg gttgtatcaa ttgatgtgtg tatgggtact gtcagtgcct 1680
attcagtttc cttattcaga gtgtgtgtag ttataacctg ctgtttacta cagtgcctat 1740
ttgtgtatgc attgtgaatg ttgggctgtc agtgtaggtg cagcatggac gtgaatatat 1800
taaagcaata aatcacttct atcttctttt taatgtggaa ttagactgtt aggatattgag 1860
ccagccattt tttctctttt tatattaaat aatgtctatg ttcttgagg aaacatgttt 1920
gtttcattat tgcattgtgc ggaccagaac actaagcggg atcttttaat ttttttttag 1980
ttttagactt tatttatctt tgttctatgt gtagagtgt tttgcctgca tgcacgtctg 2040
tgccagtggt tggccagtgc ctaggtggc cagaagagga catcagagct ctggaacta 2100
gtgacagatg gttgtgatcc accacctggg tccggggaat caaacctagg gctttttggg 2160
agaaccactg ggaagagaat ctggaataat aataatgaaa atgttggagt gtttgttctt 2220
agtgttagca cactccccac aaagaaccat tagcagattc atgaatcttt tattttcatc 2280
tgtagttcat cgggacaaat aaccacttag agataatcct cagttatgag gctctcgata 2340
ggggctgaga gatagctagg tggctcactg aatgctaacc tcattttgta gataaggaaa 2400
ttgaggccaa taggcctaga cacttgccct aaggcatcgt gagttacaat ggtttaacgt 2460
ctgcctttta catatttctt ggtccatgct taagtattca gtttcaattt agagttagta 2520
tgttccctgt tgagaagtat cagagaaaat ctgaataatg aaacattggc agctgaaagc 2580
caaagtaact gttctgtgtc tcacctctc tccctccctc cccctctctc tcctttcccc 2640
tcccccttcc cctctctctc ctctcctgtt agcataaatt actgtcaaac ttcagctatt 2700
tttttaatgg agatgttttag gcaaatttta gctaaagggc ggctgtgacc tcaatgacat 2760
ttcagccgga gagccttgtg gtcagtggtc gtttctgtct gtagaaagtt cctttttctt 2820
ttgtcttgac atccaaatgt gagaagggcg cggaggtagt gagcaccttc cttgatgccc 2880
aagcccagaa gccttttagc tgatgttttc taagagatgg tgatgggtga cagctcagag 2940
aatacttaac ctctctgaca ttgtgaaaag tgctagggag agtgacatct tgtgtgtaga 3000
tttgaggct gttggagcaa cttgataaat gctttattgt ctaatacaac acgttgatgt 3060
cattaaggag agcaaggcat tattacttac acctgtgcct tctgtccctc cctgctctct 3120
tcttccctc agtttccctc ccttttactc tccttttctc cctttctggg gacgaaacct 3180
aggttgctaa caagcactct accacggaac acattttatg tcattcggat tttaaaagtc 3240
tagccaata aaaaaaccaa aaaactcatc taaagagtgc ttgaaggata gccctaaatc 3300
ttgaaggact cctggtgctg tggaccggcc tcagttagat ggtggaggat ggcattggct 3360
tgctgtcttt gatggtgaaa agaattgttg gcttgctctg gtgcagatag ttgggattac 3420

```

cagattgtat	ttggtggcaa	attcttggaa	ataatttgtt	taaaggagta	acatttggaa	3480
gaatgaattt	ctactatggt	tctcattttt	ttatgttatg	tttgctataa	ctttattcag	3540
ctaacataca	cacacacata	cacacacaca	cacacacaca	cacacacgca	tgcacacatg	3600
ctagacggat	gaatggtgct	ggcggcacat	gcccttaatt	ccagcacttg	gaaggcagca	3660
gcagtggatc	tctaagaatt	aagggccagc	tggtctacaa	attgagttcc	aggccagcta	3720
agacctggc	ttaagatgaa	caggaacaaa	acactaagca	gaagctggcc	atggatgttt	3780
catgtctgca	gttttagcat	gtggctagcc	aagaactgag	gccaaaaaaa	aaaaaaaaaa	3840
aaaaaaaaag	tgagtttgaa	gctagcctgg	gttacctagt	gaattccaag	tctgctttga	3900
gtagctaata	agacctgtc	tcaaaaaagg	ctaggcaggt	ctgctggtat	atgcttgcaa	3960
ttcaaggatt	tgggagacac	tggctggagg	cccactacca	atttaaggcc	aggtattctg	4020
cgtagctagc	tggagactac	ctagcaaagc	cccggttcaa	gaaaaagtat	tttcacagag	4080
acaggaggat	tgctgcaaat	ttgatcaagg	gaagcctggg	gttcatggtt	tcaggccagc	4140
tggggctatg	tagagaaccc	cgtgttaaag	aaccaaacca	gaacaaaacc	acagcagcag	4200
agagtagaag	ctgggcagga	gccaaggaga	atgagtattc	aaaaccccac	ccaagtcttc	4260
atggaactgt	aggcctagtg	gggaccagag	tgcacactgt	tgcagtattc	acctaaggca	4320
gaggagttag	tggctcaagt	ctgaggctac	ggaggcagag	agacctggga	tccgatcctg	4380
gattcactgc	ttcttgggtc	gaagctaagc	ctcagtcctg	cctgtcccac	cacggccacc	4440
ccccagctcc	cctcctgtcc	caccacggcc	acccccagc	tccccctctg	tttttttttt	4500
tttttttgag	acagagtttc	tctgtgtagc	cctggctgtc	ctggaacact	ctctgtagac	4560
caggctggcc	tccaactcac	agagatctgc	ctgactctgc	ctcccaagt	ctgagaccaa	4620
aggtgtgcac	caccactgcc	tggctgagcc	tcagttttct	tacctaaact	taaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaag	acagacaaaa	gggtgggggg	aaggtcggtc	tgttggcatg	ttggcacatg	4740
cctacaacct	gaggatatac	gggagaccct	ctctcatgca	agtgaatgt	ttagagcatg	4800
cagctccaca	gcaagagccc	tgtatatctt	aggttcttag	gaaaaggtcc	aaggatagag	4860
aggctcattc	tatacagggg	tgagaggtta	caggagggtc	agtttccggg	aacaccagag	4920
cacttacagg	agggttagga	attcttgcag	agcttgtaga	gttctttcaa	ggtggtgggg	4980
gcgtggatgt	gctgagctta	aaacagcata	gtgggtttag	gggctaaaag	tggaagctct	5040
taattgagga	gaaggaaaca	ggaaggccac	agagccacat	cttttatgcc	ttctcttctg	5100
atcatgtcac	tagaactgtg	ttttaaaaag	attgaattct	tttcatgata	gtaatatatg	5160
ctgtgttaaa	aagctttacc	tgttttctct	ttaatagttc	agtgtgtgtt	ttcccagaca	5220
ctctttaact	taccagttca	ttttggatct	attttattga	aaatcatttt	aacagctcaa	5280
caaaataata	tgggaaggcaa	atctaccccc	ataagaaagt	gatgtttaga	ccttggcttt	5340
ccatcttgcc	agctctatct	gtggttaata	atgactttac	tcaccactga	acaattgacc	5400
tgacctttga	ccttttaaat	gcgtcagtc	agaaactcac	attctgagct	ctcctaaggt	5460
aactattgct	tgggtgatgt	gcttgagggt	tttgtggtag	atggacagac	gcaatggcat	5520
tctaaagcag	cgttatgagg	ccagacacct	tgggtttgaa	ttttcagata	caacacctct	5580
ttgtccttaa	ggctgggtgc	tttaacatct	ctgagtttca	atttctttgt	ccacaaactg	5640
cctgctgggt	ccactcacag	ggtagctgtg	aagaccgagt	gagatcattt	gttacatcat	5700
aagaaatttt	gcgtgggtgc	tagcacgtag	ctaacattca	aatgatatca	attaacactg	5760
aaatcttcaa	tctttctctc	tggttaccaa	ggtgggcaag	ttatgattca	tggcaccatt	5820
agtgaactga	aggaagaaaa	gagtaattag	gagattttga	cctacagggg	aagctaagtg	5880
actagggact	ggggattttac	atggtgacag	aggagatata	tctttgacat	agagatatag	5940
acatggcaaa	ctgtacattc	ctgttacata	gaggctctca	tgataagcct	ctttgcagct	6000
tcaaagacct	atgatccact	ccatgtatct	taatagtcaa	cacattgaaa	gttatcacta	6060
ctcagtaata	gtcccttgga	gtttttcatg	ctcttaagaa	gtatagacag	ctacaggcta	6120
ggaacatggc	tgagttggta	gagtgttctc	ctagtgtgta	tgaagccatg	gcttccatcc	6180
ctaggactag	ataaaccag	atttagtggc	acactcctct	aaaacccctt	gttgggtgga	6240
gataagaaga	tcagaagttt	gaggtcacca	tggactacac	tgggagtatg	aggccagtct	6300
gggctatgtg	agacactgtc	ttgagacatg	ggtgggtggt	gtgggtgttg	ctgggtggcat	6360
ggctcagtg	gtaaagggtc	ttgccttcag	gcctgaccac	ttgagtttga	tttctttctt	6420
tctttctttt	tttttttttg	agacaggggt	tctctgtata	gccctggctg	tccctggaagt	6480
cactttgtag	accaggctgg	cctcgaactc	agaaatccac	ctgcctctgc	ctcccagagt	6540
ctgggattaa	aggcatacgc	caccacaccg	ggctacgagt	ttggtttctg	gaacctgtgt	6600
gatggaaggt	gagaattgtt	ttccacaagt	tgtcctctga	tgtccacacc	tgcagcatgg	6660
tttatgtgtg	catacatatg	cacaactaga	gtaatagact	aatgtaaaat	gattttattt	6720
atttattttt	aagaatatat	atatatgtgt	atgtatgtat	atatatgtgt	gtgtgtatat	6780
atgtgtgtgt	gtgtatgtga	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtac	actctacact	ctagctgtct	6840
tcagacacac	cagaagaagg	cattggatcc	cattacagat	ggttgtgtgt	gagaattgaa	6900
ctcaggacct	ctggaaggga	agttgggtgt	cttaatcact	gagccatctc	tccagcccc	6960
aaaacaattt	tttaaaagg	aagcagagag	aatatgattg	gtggtgtgtg	ttcataaacc	7020
ccagtgatgc	tgaagctgag	gcaggaagac	taggtgtttg	agaccagcct	ggaacttgct	7080
cagattctgt	gtcagatttt	tgaaaaagg	ccagagatat	ataactcagt	gatagaacat	7140
attcctaatt	tgaacagagc	tttgggttca	gtctccagaa	ccacacataa	ttttatacac	7200
tatatatata	tcacacacac	acacacacac	atatatatca	catacataaa	cacacacgca	7260
tatatatcac	atacataaac	acacacatat	atatcacata	catatacaca	cacacacaca	7320

catatgtaat	gtgtgtgtat	atgtatatat	gtatgaatga	gagacagagt	ctcagtatgt	7380
agctctggtg	gtggcaggcc	tggaactcac	tctataaacc	aagttggcat	caaactcaga	7440
gaacagagat	ctgcctgctt	ctgcctccct	ggtatttcta	ttaaagggtg	gtgctacat	7500
agcaaaaaga	taagggacag	atactcttgg	acagttgaag	ggtagaggag	tggttagggg	7560
tgaatctttc	ttaggaagga	ggagacggga	gaggggaaga	agagatccag	aaggcttgga	7620
cgttggatga	catccatgaa	tgaccacat	gatgctggaa	gttgctttgc	tgtgtcctgt	7680
gcagctgata	gcgtctctct	tcacatctgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	7740
gtgtatgtgt	atacaagcat	gtgtgagggc	gtgaatggac	gtgcagatgt	tcacagttac	7800
ccttcacttg	atgtgtatat	acagctttat	cttcctgttc	tgttaactttt	ctttgtacct	7860
aacaagtga	tagcctcaca	gataacaacc	tagctcccat	gagtcaaatt	tactattcac	7920
ctctttaagt	ttgggttgga	gaagacagga	atggacctgc	aaccagtcca	acccagtggg	7980
cccatgtgga	acagaaggaa	gccagcggag	ctagaaaagag	aaagtgaac	ttgtaactaa	8040
tggcttccgt	gttctggagg	aggggcgcag	tttattacgg	ggatgtttgg	gtagtttttg	8100
tagatgccat	ttctgaaaac	tgcttgggat	taggaaagaa	aaaccctgcc	tgtctgtgta	8160
gcatctgct	ttcccgacgg	ctgattgatt	ttattagttt	gcggtgtccc	gacctcttgt	8220
tctcggtatg	agagtctgtg	ctttgagttc	ggactctgca	cctgcttagg	tgaagcttta	8280
ctagcaagtt	tccccacatt	gtatctaatt	ctaaatttgt	tttgctttta	gagagctcgc	8340
tttttttttt	tcctggcaga	atctaattgc	attagactgt	tcctttgtct	ccccctccc	8400
cccgcacaaa	aatcctaata	acctcaaac	ccaaatgcaa	gctgtgtaat	tacctttccc	8460
gtaagccaaa	caatgtgagt	tatcattaaa	atagttagcc	tttgaagtgt	ttcctacttg	8520
tggtttgga	acaataaata	tttaatgtaa	agctgacttc	ccttggcaaa	tcagtgttgt	8580
tgtgggtctt	tttctgtcaa	aatgtttagg	aaaaacaaac	ttcttaacat	taatcaaagt	8640
aaactcatgc	ataagagggg	gtgaggtaat	taaagagctc	tgaagccggg	gtgtatgtaa	8700
atataatgtg	gtgcataata	atgtgtgtgt	gtgttttaac	aggtttcact	gtctagccca	8760
aagatctctc	cacattcctc	tgctcagtc	tctttaatac	tcattcctaa	ttacatgtga	8820
gaaaaaaaaa	ccagtatgac	ttcgttcac	agggcaggct	cttcgtggaa	cggggaggtg	8880
tctgggcgtg	ggacgctttc	aagcccaggt	gactgtattg	aagattctca	gggtcacgga	8940
gtcattggga	aagtcaagtgt	ctacagtggg	ggcactgcac	atgagagcag	gtgggaggaa	9000
ctgggaatgc	tgtaccctgc	tcagttttgc	tgagaaccaa	agctgctctg	gaagctaaat	9060
gtgggtgggt	acactgtagt	ccttgtactt	gggcagaaac	aggagcgcct	tgggtgaatct	9120
gagggcactt	gggtctgata	accagtacca	gaccagccag	ggcctcagtg	gggagcacct	9180
caaaatgcca	actgcaagca	aataaataat	aagtagataa	ataaatatgt	gtaatttcct	9240
ctatatTTTT	aaaaagctga	tttcaaagtt	tattaattaa	aaagtgattt	tttttcctctg	9300
cagaaatatc	tgggtgccct	ggatgacaag	tgttctgtgg	ggctctgggt	cagcatgggg	9360
ggacagtgca	tgccaaagcc	gtgcagagcc	ctgaaaggat	gacagaggag	ctgggggtgtg	9420
ggatgtgagc	agacactgac	ttaaacatga	gaagagaaga	gaagggtggc	ttgtccaagg	9480
gggaaaagtg	gtgatatttg	ttgcaatttg	taacatgtaa	catttgaact	tagaaaaacga	9540
ttaaaaaaaa	actgtaaaaa	aattgagctt	agcagtaaaa	attaaaaaaa	tataacttct	9600
ccctattcag	tagtttctctg	ttattaatga	atgtaagtaa	ctcttcagtg	ttatcggatg	9660
tgattttttt	tttttttttt	gtatgatgga	gactaaaaacg	tgtcagcgtt	taagtttgtg	9720
catcttaaaa	gcaatgtttt	ctaaatgact	aatgtttatt	acaaaggcac	gttggcagac	9780
attccatgaa	aggtaccagg	tagagggcgt	cttaatgtag	ccgagggtga	ccccagagtg	9840
cacacctacc	tgtcctgtgg	agctatcacc	tggcagtggt	ttaaatggca	ttaaagattc	9900
cagattactt	tgaagagtg	tgtaatctgc	tatttgcctat	tcagcatatc	tggatgaagc	9960
cagctctcga	tggagtaacc	aaagcaatat	actgcaacaa	gcataatgaa	gctgttctga	10020
gactccaaca	gtcttttccc	tccctccctc	ccttcccttc	cttccttcct	tccttggctc	10080
tcatgcatgt	tagactcagt	tacttagcca	cggttagccc	tgaacaccga	atccttctgc	10140
cttcacctct	caagtgtctg	gagaatacac	ctgaggcatt	gcaccaccc	agctttaaca	10200
cttttctatt	ttagattact	aaaattttct	ataaaaaaaaa	aaaaatgcag	aaaaatgcag	10260
ttctgggaga	gccagggtca	cacagagaaa	ccctgtctcg	aaaaacccaa	aaaaagaaaa	10320
aagaaaaaaa	aggtattatt	agctgggcag	tgggtggcca	cacctttaat	ccagcacctg	10380
agagacagag	gcaggcagat	ctttgtgagt	ttgaggccag	cctggtctac	agagtgtgtt	10440
ccagaacagc	cagggccaca	cagagaaacc	ctgtcttgaa	aaatccaatc	aaatcaacca	10500
accagacaaa	aggcacattt	aatttttatga	ttctctgtat	gtgcaggcat	gtgtgtggag	10560
atcagagagc	aattttctgc	tgtccgatct	ctgtttccac	ttttatatgg	gttctgggga	10620
tggaaactcag	ggtgccaggc	ttgtatggtt	ggcacctttc	cctcaactcc	tctgagccct	10680
ctctgcagcc	ctacatttgt	gaaactttca	gcggtgccgc	ttttccctact	gatttctccc	10740
ccttcggaac	atgtgggttac	ctttcatagg	ctattcctgc	gacttatgtt	aatgtgctgt	10800
gcacagttaa	ttgcttaaat	gaactttgtt	tgagacagtg	tcttctcgtg	caatctatta	10860
ggctggcctg	ggattttagg	accttccatt	ggggcctctt	ggccagctta	tacttataac	10920
ttctattgat	aggtgggtatc	taatagggtat	tttctgggtg	tttgagtcaa	ggtcttggtat	10980
ttccaagtac	ccttgaactc	acagatccta	agctggcttc	agttttgtgg	taatccttct	11040
gcctcagcct	ccattgtgct	gggattacaa	gtacatgcta	ccactacaaa	tttttaggca	11100
tctctaataa	atatgggtctc	tgtaaatgaa	gctttgttag	ggtccttaaa	ttttgatagc	11160
aagaccagtc	ctaaaaacag	tgcattttga	gaactgttaa	aaactattaa	aacagccggg	11220

tgtggtagca	cacaccttta	atcccagcac	ttgggaggca	gtggcaggca	gatttctgag	11280
gccagcctgg	tctacaaagt	gagttccagg	acagccaggg	ccatacagag	aaacctctgc	11340
ttgaaaaaca	aaaaaacaaa	caaacaaaaa	aactattaaa	actattaaaa	ggttttggta	11400
taaatattct	tgagctgttt	tgaggagcta	gggttgggga	gggagatgac	atctatggct	11460
ctgattaagt	ggtctcggga	cattgttaac	actgtgccag	gtatcatggt	acagatgggt	11520
ccgtaatttg	agaaacactt	ttacaagggc	cataaattct	tcagatgaat	gaagtcctgt	11580
ctagaagttt	ggaagttatt	gtcttaaaaga	aaaactgctt	tggagattcc	tttttatctt	11640
gattttccct	ggtatttatg	tctctaagaa	tgaatcttgg	attgctgtctg	attgacaaaa	11700
gagccatacc	tcaccagatt	ctggtagctt	ctgagtgtct	ggttgatttc	ttttcttggt	11760
ttgtttttct	tttcttttct	tttttttttt	tttttttttt	ttgttttttg	gagacagggt	11820
ttctctgtat	agccttggct	gtcctggaac	tcactttgtt	gaccaggctg	gcctcgaaat	11880
cagaaattctg	cctgcctctg	cctctgctgg	gatcaaaggc	gtgcataacc	acacccggct	11940
tgttttgttt	ttctaagaaa	gggtctggat	aaccctagct	gtcctggaac	tcaactttat	12000
agaccaggct	atcctcaaac	tcagagatct	atctgcctct	gcctcctgag	tgctggaatt	12060
aaggctttca	acaccacacg	cagctataat	ttttaaagat	aattctgatg	cgaattacag	12120
tttaatttgg	aaagaaatgt	tgacttaaat	cagatataaa	aggaagtttt	tttcttgctg	12180
tagtgactgt	ccttggatgt	tatctgccat	gcactcactt	ccctttatca	gctgtagtca	12240
cttctctctc	ctgtccctct	ctataaaatg	ggaagacttt	ttactgggag	cctgctgata	12300
tcacagtac	cctcaggggt	ccctctgggt	gagagagtga	ctggagagat	tccttgtgaa	12360
ttcttgcttc	cggcacagggt	tacagctctc	cctgaaacct	gaatagggtt	gttgtgtgtg	12420
tttccctcct	cctcctcttt	tttttttagc	agagtttctc	tgtgtagcca	tgactgttct	12480
ggaacttact	ctgtagaaca	gactagcttt	gaactcagat	ccacctgtct	ctgcctctgc	12540
tggaattaat	ggcttgttcc	acctctgccc	agcttgttcc	tttcttaaaa	aaaaaaaaat	12600
aaaatttaact	ttatttagtg	tatatgtatc	cccacatata	cactagggtca	gaggacaagc	12660
ttcaggagtc	agatcttgct	ttctatcatg	tggaccctgg	ggattgaatt	ttggtcttca	12720
ggtttggcag	cagcccctgc	tgagccattt	tctgacccta	atattacatt	gttgttgctt	12780
tctgtgtggg	agccaatcat	gagagcagtc	gttcttattt	attcttctca	gtatgttatt	12840
aattttgtga	agacttcata	gaaaagcttg	tgtagttaat	ctttctgggg	tcagactgct	12900
tgttttgttt	tgtttttgct	tcgtttgttt	gagacacggt	ctttatocca	ggctggcctc	12960
attgtatagc	tgaaatgac	cttgattttt	gtttttgttt	tttgtttttt	tgtttttttg	13020
tttttcaaga	caaacccttg	ctgggttgca	actggcttgt	agaccaggct	ggccttgaac	13080
tcacatagct	gcccattctct	gcctcctgaa	tgtctgggatt	atagcatatg	ctaccatagc	13140
tggtttatgt	ggtgccagggt	atgctaggta	aacactctac	caactgagct	acatctccag	13200
ctctaggctt	gtctttttta	aagctttcca	taaagttaaa	ttcatttcaa	acacacacac	13260
acacacacac	acacacacac	acacacacac	ctcacacagt	ttgagtcatt	gttataaagc	13320
tctgtgtggg	cctgttgctt	gatataatgt	cttcattggc	cttagacctt	tggcaatcct	13380
cctgtctctg	cttccagagt	gctgggatac	aggtagggtg	acaaagtaga	aaataacctct	13440
tactttccct	gtccagtttc	tccattgcta	gcactctgca	ttagtgtgat	acatattatg	13500
cagttgataa	tagcagctat	atgttggtat	taattaaaga	atacacagtt	tctatcacac	13560
tttactgtta	catattcttt	gctgtttgat	agtgttggag	acatgttgtc	tggtgtagct	13620
caggatgcaa	gtaaacttgg	tctcaggttc	tggagtctctg	gcattccagg	gtggccacca	13680
tgtgcccctc	tgtgcttggg	ccattttgtg	gatttccaca	gacatgctgt	gtggccacca	13740
gcacagtacc	acttgaagta	cactctgcct	ccatagcccg	gtgctctacc	cactcaccoc	13800
tctgcagccc	ctgccagtcg	ctcatcccct	ttttctatct	ccatagtcct	gtttttcaga	13860
atattcatct	gacatcatgt	aagcagtagc	cttctaggca	gcagtggccc	agtgcctctc	13920
tggttgcgct	tctttcacgg	agcagtatgc	gttcagcttc	ctccttgctt	ttggtagctt	13980
tgcgaggaaac	actgccttgt	atgacccttc	ccttagtgat	gttcccttca	tctgaagggc	14040
atcttggtct	tgtcgttttg	gctgatagga	ataaagctac	ccattattgt	ttgggtttgc	14100
actcttctaa	tgaccagggt	ggcctcgaac	tcagaaatct	gccgcctctg	cctcctaagt	14160
actggctttc	atatgccgtc	tgtgtactct	ctttgggtgtg	atatcggtac	agactttctc	14220
ccaattttgt	tccatatttc	cgtacaatgg	aaattgaatt	tagggttcca	cagctgggtg	14280
tagtggcatg	ttcctttaat	ctcagtgtct	aggagacaga	ggcgggcaaa	actctgttga	14340
gtttgaggcc	agactgatct	acagagggag	ttacaggaca	gtcagggtct	cacagagaaa	14400
ccctgcctca	aaacaaaaaa	gcaagcaaga	gttttagggc	ctacttactg	gcaagtgttc	14460
tttaccactg	agctacaccc	cgatccttat	tttaaaaaat	ttattttgag	accagggtct	14520
cataactttg	atcaggccag	tcttgaagtt	gtgttgtagc	ccatgcagga	cctgaccttg	14580
ggaagcacct	gtcttgggtt	tcccagtagc	tgggcttaca	ggcctgctct	gccaggccca	14640
gctctcacc	agattttac	ggagattttt	ttttttaaat	tgttgagagt	tttaaaagt	14700
tctcagctctg	tattgtatat	acaagtgtac	atgtacattt	gggggaggag	accagggccca	14760
taacacacaa	ggcaagctcc	aacactgatc	tgtagtcata	gttttctttc	gatgtattgg	14820
gtttttttgt	ttttttgttt	ttttgttttt	tttggtttgt	ttttgttttt	ttcatgaaac	14880
tcaatgtctt	aacacttgtt	agactgggct	atgcctctag	cccgcctcct	ttttagggtg	14940
catatagttt	taagtttttc	ttgttgagga	attcagctct	atgcagacac	taatgctgtg	15000
agcttggaag	cagagacaag	gaagtgaagt	actgttatct	caccagccca	aatggataat	15060
tatgatctta	acctttagct	ccactgcctt	tagataaggc	tgggcatggg	gctgcagccc	15120

caactacata	ccaaggtgct	gacactttctg	ttctgactgc	tgtctctgct	cttagacctg	15180
tcccctggat	tattttctgac	tcctcctttg	gaactgagcc	ttgctgactt	ggatcttgcc	15240
cagcttctac	tctctgttgc	tgctgttttg	tcctggtttg	gttccttaac	acagggttct	15300
ctatgtagcc	ctggtctggc	tggaactcaa	tatgtagacc	aggctggcct	caaatttgca	15360
gcaatcctcc	tgctctgtg	gaagtggttt	ttttcttgaa	acaggatcca	acaagctacg	15420
tacaaaaaat	ggtcttaagt	tactgctagg	tatgtaacct	tgggcaagca	ttgacattaa	15480
ggcacacccc	caacctgaaa	aataattggt	tgagaagaat	cagcatttct	agaattattc	15540
ttcttggttt	ttaattttaat	tttatttttt	aaaacttaaa	atgtgtgcag	atgcatgggtg	15600
tatgtgttgt	gggggggatgc	aggtgcttgg	tgtttgata	gaggtcagag	atcaattttg	15660
tggagttatt	ttttcttcta	tctttatgtg	agtcccaggt	taaattcagg	tcaccaggct	15720
tatacaacat	gcccctaccc	actgggccat	cttattggcc	ttcttggggc	ccattttaat	15780
ctctgtcttt	tcgggggtat	aaattaaagg	aaaaaagtaa	aacatagcct	tccagggggc	15840
tctgggcttt	atttaaatta	aaattttcaa	aatgatttta	ttttatctgt	atgggtattt	15900
tgcttgcag	aatacctgca	gttcacggag	gccagaaaag	gacatcagag	tccttggaac	15960
tggagttaca	gaggttggga	gcacctgtgt	gggtgcttgg	aatcaaaccc	aggttctctg	16020
gaagagcagc	cagtactctt	cttaaccagt	gagccatctc	tccagccctt	tttcttgagt	16080
cttacagacc	ttctcttatg	cccttctctt	ccttggtcatc	cttcttctga	actcaaaggt	16140
tgaagagcct	ttgcccctctc	tgggtgggggt	tctcttctct	tcactttctg	tgttctctat	16200
gtaggttatt	tcagccactg	ctttgatgta	tgatgtgatg	ttacatggct	ggggagtaaa	16260
cccagggtct	tgtgcatgga	aggcaagcga	gcaccctacc	gactgagcta	ggtccccagc	16320
tcacttagcc	attacttttg	ccataattct	gataatgacc	accaggtgtt	catctccacc	16380
cctgtaggct	tctagcacc	acctcgtgct	gctttccgac	atctctccat	gggtaccttg	16440
tgtgtacttg	cctcttggtc	ctactgttga	aaacttaacc	ccatagccac	ctctctgaaa	16500
gtctgtgctt	ctctcttctg	tcacaatga	aataaatgat	agttcttggt	ctgctgtctt	16560
agttactgct	ctattgtctgt	gataaaacac	catgaccaag	ggaacttgaa	aacatttagt	16620
ttggagttta	tggtttcaga	gagttagaga	ccataatggc	agggaacctg	gcagcagaca	16680
ggcagacata	gaactgaagt	aactgatagc	tcacatcttg	agatgtaatc	acaaggcaga	16740
gagagagaga	cagacagaca	gacacagaca	catggggcag	ggagactgag	acacagatac	16800
agagagaatg	ggagacacac	tggaatcct	gttagtcttt	tgcaacctcc	aggcctgtac	16860
cctatgatata	acttcttcca	atgaggccat	acttccctaat	ccttcccaga	cagttccacc	16920
aactggggac	caagtattta	aacacacgag	tgtgtgaggg	ccactcctat	tcaatcatca	16980
tactgtgcaa	gccagagccc	cccagccaac	cttgactcct	tcctcctctc	atcctcctgc	17040
ttctgttcag	atcggcagcg	agtcttgatc	tcacatctcg	agtttcctca	actccccttg	17100
actgtcatgt	cccttctgtg	gtggtgatgc	taaaattgct	cctgtacaag	actcgaaatg	17160
ctggataaat	ggagctctcc	agtaaaaaga	aaacttaaga	tgcaaaagca	gatagtctca	17220
tcaaaagaaa	gaacagatgc	aggcctggag	tgtttcatcc	cacaccactt	ctaagtattg	17280
atccccagtc	acagccctaa	aatgcctcag	gcttttgagt	gctgcattat	aggcatagac	17340
catcatgcta	ggcttcagga	gttctcactc	ccatcccttc	acaccttgac	ctggcttcac	17400
tgtgcagccc	atagcccagg	ctggccttga	actcaccatt	ctcctactct	agcctcccaa	17460
gtcctgggct	tataggcttg	tgttaccaca	tcagcttat	aggatcatca	cctattctcc	17520
tgtctaccgc	tgaggtctct	gacctggcat	ctactgtacc	ttccacctcc	agcttggggc	17580
tgtttgaggt	tgtaggccat	actgcacatc	caacagcact	ttggtgctat	tttcttacct	17640
gtgctagctc	aggtaccatg	ctgcactctc	tgggttctag	agttctatga	gctccccccc	17700
ccaatccctt	ccatcttgct	tttcattctt	tgtccatgtg	cttaggttct	gatcactcag	17760
aagattcgtc	acattccttg	ttttcacacg	ctgttccctt	tgcttagact	ggctgcccct	17820
tctctccag	aatggccagc	tctcctgtag	cctgctatc	tttgtaaac	tttcagctc	17880
tcattcttag	ggctgccatt	ccatcaaac	agtgctcggt	gccttagaca	gtaggaaacca	17940
agctgcgtag	agcttgccgg	gactctttgc	cttaccagat	gctaccccaa	gctgcctctc	18000
aggctttgtc	tttgtcttag	aggaggctct	gactctacct	gtgtttctct	gggcttagca	18060
gagcacctgg	caaagagttg	ctgaaatatt	cagcaagcca	gtggagccct	gtacggctgg	18120
cctgaatcca	tagatcggtc	agaaaaccac	agagaaaaga	aaagcatgca	ttttgcatgt	18180
tgctctacca	tgagccacaat	tatactcttt	ctttttctga	gatagcctct	gagcagtctc	18240
aactattctc	agagccacaa	agtcttagtc	atctaagtgg	tgggtttgag	aggcagacac	18300
cagactctgg	tgctcatggg	cgaggatggg	gctagaggtg	agatctaggg	actgccggag	18360
tgtagagtg	gctttgaagg	agtgagactg	catgaatcat	ttagaaagtg	agttgtagag	18420
aaagcaggag	gtttatatta	agagagtttt	acagcaaagc	ctgtccctgt	aaaattgtga	18480
aatattttct	catgaatggt	agactctgta	aagattgcac	tcagtcattc	atgtgggaaa	18540
aatatctttg	gaatcaacaa	acacagtgaa	ccaccttgaa	cttcatgctt	aatagacaaa	18600
cattgtgtta	actctttctg	gggcagggat	tctggagaca	tggcaggggg	tggggggcgc	18660
ttgtcttcac	tgtgtgatat	ctgggtatca	gctgggaagc	cttgaacatc	tgggcttttc	18720
tttagttccc	agcccaggcc	tggcctagca	tgattgcagc	tgtgatggta	gatcaactgc	18780
atgtggcctc	tttgtctgtc	ttgtgtttct	tgtagaatgg	tggttgggtt	ctggagcgcc	18840
tttgtccttt	caggagaatc	ccaacagagg	tgttggagat	ttcatatcaa	gcttgggtctc	18900
atggcacagg	tagttacttg	tagttacttg	ggaggctgag	gcaggaggat	ctcaaattta	18960
aggcttgctt	atactactga	gtgattttcaa	gaccagactg	agcaatttag	taagactttg	19020

tttaaaaaaca	acagaccccc	cccccaaac	ctcgaaagtc	aggtttaatt	cctcagcacc	19080
acaaatgaga	cagtgcattt	cacactttca	gcactgtgat	gctgggctag	ggatggcttt	19140
agccagggtcc	aggggaaggg	gagcaaagga	tgaggaaggg	gacagggttct	ccatccaccg	19200
ctggacgctt	gggtgtgagg	ctctcctaca	aatccactat	gagatgacgt	caagggaaag	19260
gagcagggtgt	gtgccaccat	acaccctgga	gagaagaatt	tcctccctcc	tcttccctcc	19320
tgagccccctc	cctccctcct	ctcctccctc	cttccctttc	tttttacctc	ctttttgagg	19380
cagagtctta	ccttgtaatc	caggctgttc	ctgaactcat	ggccattttc	ctgcctcagc	19440
cttctgagtg	ctaataattac	agatataaac	atatagggtc	ttagccctact	ttagcctctg	19500
ctgaataaca	aagggtcttc	ttgggggtcac	ttaaaggaaa	agtgcacctga	ataaatttgg	19560
ggaattttctt	tctttttctcc	agtaatcatt	gagctacatc	gtaggcttgt	gactttgaaa	19620
ttccaaactt	catttccctt	atcagatcct	gtatctctac	ctccctagca	ctggctccca	19680
agcccacgct	gcagggtctg	ggaccccaac	ataggtccta	tgcttatgtg	gcaggcccat	19740
acagggtctat	ctcctcagcc	ctgaaatgtt	tgtttttgat	ttgagtaaca	tttctcttgt	19800
taaaagatcc	ctaaaaagtc	gttgagtttt	ccaaacagca	aaacagaaga	gctggactcc	19860
tcaatgaata	cttttttgct	gggagtgtgt	cttcaactttg	gaaaatgtgg	tccccttagc	19920
caggagtggg	ggcacacgcc	tttaatccca	gcacttgga	ggcagaggca	gaaggatttt	19980
tgagttctcg	actagcctgg	tctacaaagt	gagttccagg	acaaaaaaa	acaaaaaaat	20040
gtagttccct	taatgccaga	taattccctc	cagcagttca	tcagttctac	tacacacaca	20100
cacacacaca	cacacacaca	cacacacaca	catgctttct	gttcatctgt	taggaactgg	20160
acactgtgct	ggatgctgga	gaggggggca	cattagttag	ccgaagccaa	ggttcttctt	20220
gtcatcatgg	accttagaat	gaaggagtgt	aagcaaggca	taggtccctt	gatactgaag	20280
gcaagcacac	atgtgaaggc	ccgtgaacgg	aggagttag	tagccaagt	agtgtaggag	20340
tgtagctagc	aggcaagtgg	cagccagaca	gacacagggc	tatcttgtca	tgcatgtttg	20400
ctctgtcctg	ctagctttgt	gtgcttttaag	tccggtctga	cactgacct	gtgaagttag	20460
tacagttgtc	ttctattttt	ctgcataagg	aaggctagac	acctggcacg	catctcggag	20520
gggagttagg	gtccacaggc	tgttgctttc	atagttgatg	atttttagtc	tcagagcaaa	20580
aagtggtag	cctttatgga	cgtggatggc	agctcttcag	aaagcctgga	gggatgcagg	20640
cagatgtgca	gatacaggta	aaagctccta	gctgtgggtt	tgtagaagcc	tgggagtgtt	20700
ttagaacacg	ctagagtaca	gactctggac	atctgacct	tttggttaaa	tgtcaacctg	20760
ctttatctct	gcgcattgtt	attattggga	tgacgcggtc	tcagtgctcc	aagttagcgg	20820
agctgaaatg	gcttcagagg	ccgtgcagcc	ccttgccctc	ctggagtctg	cattatggct	20880
gtgatacctc	aaggaagagc	atctccatgt	aagtgtcaga	tgcaacagga	acgaggcagc	20940
tgccccgtac	ataactctct	tcattgccatt	gcccagtgaa	gttatatctg	agaggctctg	21000
tttttgagga	cggtctctca	gcactgactg	tccctggatct	cactctgtag	accaggctgg	21060
ccttgaaactc	acagagatcc	tccatgcctc	tgctcccaa	gtactgggat	taaaagcatt	21120
tgacaccacc	accagtttta	gaattccatt	taaattgtca	tctacacaat	gactgtgacc	21180
tcccagatgt	ggccaggcac	agcaagacta	acagaccctt	tggtcagggc	gccatacatc	21240
tggttggaact	ctggaaaagt	tctttgactt	agcatcgctc	ttgactcatg	acaaaattcc	21300
cagatcagaa	tccccaggag	ctctgacagc	aggctgcac	aggatgctgc	tccatgccat	21360
tactgctgt	gagatcctga	ataaatcatg	tcaaattctg	ggccttcatt	tctcctcggt	21420
aagatgaaga	taaaatattg	tcttgacca	tgagtgggt	caacaggtaa	aggtgcttgc	21480
agctgagccc	gacagcttac	gtttgatccc	taccacccac	acagtgggag	gagagaaatg	21540
actccttgaa	gattgtcttc	tggtgcacc	acatcatcat	tatcatcaat	ggtagacaca	21600
aagatgagat	gaaagtcca	cacgggtattc	agctatagat	actggttttc	ttcttttctt	21660
tcttctctct	tttttttttt	tttttttttt	tttttttgaa	gacagggtct	catgtagccc	21720
aggctatctt	caaattctct	gtataataag	gatgaccttg	aacttctgat	gcttttgctt	21780
ccacctcccc	agtgtctgct	tgtgcacatc	tccatgccat	gcctggtttt	atgtggtgtt	21840
ggcagtgga	cccagggcct	cgtacgtgct	agggaatctc	ttcactaact	cagctacacc	21900
tctagctttt	ggattgttct	tcaaccaagg	ctctgttgga	cattcatctt	tttattttga	21960
atagtactta	gtgggttttt	cattgtatgc	tgctgggtgg	ggttttaaga	cagggtctag	22020
catagtccag	gttggtctca	aactcaccat	ttagtggaag	gatgtcctta	aactgatctt	22080
cccatatcta	agctctaagg	ataggaattg	aaagcatgca	ttttcatctt	tagtgttatt	22140
aggcctagag	ctatcctgtg	caaaaatatgt	gtggagagat	ttgatcatct	tcagacatct	22200
gtcctgaggt	agggtcacca	gatgctaatt	ccccccaccc	cacccccagg	atatgacagc	22260
agggtccatt	ataatgcacg	tgcttctcca	tatcagggaa	agctctgtgg	ttgtctctga	22320
taacacctag	ggaattggat	gaactgtttg	ctctttggct	tcctgaggca	ctgagaaatg	22380
gaattcctgt	taaatgagag	ggtcaaagac	tcagaaggag	caactactgt	tcacctgtga	22440
cgctacttaa	tttttagtacc	atccttcgga	ggcggggtag	tccctgttgt	gctgaagagg	22500
aggcctattc	agcagtcagg	ccttgtagag	agagtgggaag	ggtcacagcc	tggggagggtg	22560
accttacgca	caaactgagt	ccttttctct	ttttctagag	ctagaggcag	ctctgaccgt	22620
cgacttagtg	gttgacaaaag	cacgtctggc	tgtgtcaatc	taaaggtttg	ctgtctctctg	22680
gctcctttta	tctacaatat	ttgaaatcaa	atatggtgca	tatcccatat	cagttatgga	22740
tttttgtagt	aaatatttaa	tctcaattgg	gggtttctac	cccaccttag	atcatttttag	22800
tcccagataa	aagaccctaa	acttttatat	cttaataaag	ccttaaacaa	actaaagct	22860
gagcagatat	catctctctg	tgtctatttt	gtctactttc	aggcaaataa	ccctgagcta	22920

tgacttgccg	tggtccactt	gagccgctct	tactccactg	gccagccctc	atggccagat	22980
ctcacaaatct	cttaccat	ggtgtcttcc	tctctccacc	ttctctctct	tccctttcat	23040
ggtcctttct	ctgaccccaa	gccagaaaac	caaaattcta	cccacctctc	ttctgcccag	23100
ctataggctg	taggtgtctt	agtcaaccaa	tagtttttaa	ctaaggagca	aagttgcata	23160
acatgacttg	gtgtgtttga	ggatttcctc	atccctgggg	caaccgaccc	tggggccagt	23220
attccgcctc	acagtacata	ggaataggtc	agtgcattat	ttgtttttgt	ttctctctgt	23280
ctccttcccc	tacccccctt	tttcttgact	ttcatgctgg	aagtgaagag	gaagtgggtga	23340
atcacacactt	taatcctagt	accaggagg	ccaggcaggc	agatctcttg	atgttgaggc	23400
cagtctgctc	tacatatcca	atttcaggct	agcccgagct	acatatatgg	cccaaagaa	23460
ggctttttga	cacactgtga	aattgaacag	gaattgtcct	cttttaaaga	tagagtccca	23520
cttagctcag	gtgggcactg	aacttattat	gtagctgagg	cagactttaa	actcctgagc	23580
ctgctgtttc	ttccttccga	atgctgggat	taagggtgag	tcccattaca	ctcgcttcag	23640
aaatgtctct	gtatcacttt	ctgttggtga	tttttatttg	catttgcat	ttgtccctct	23700
cttcatcctc	cattttaggt	ttactggttc	atttatgttc	atacatgtct	tagagagttt	23760
aggaagttgt	gtgattaaat	cccttctatc	tgtggtctcc	tgtggttccc	ctagtttctt	23820
tagactgaac	tatacaaatg	aggactgtta	ctttaatgat	aatttttcta	ttaagaagtt	23880
ccttattaga	ctgaaattat	tttctttatg	acttactggt	ggtaggttat	tccccacagg	23940
gctaagaaat	tgctgttttg	aaaagtctag	aaggatttgg	tgacatgctg	tttcattttc	24000
cttttctcct	gagctataga	aactaggatc	atcagggact	agagagatag	cttggttatt	24060
gagagactctg	actgctctta	caaagaacac	aagttcagtt	tctagcacc	tcatggccat	24120
tcatcatcca	actgtaactc	tactttcagg	aaattcagcg	ctcgtgtctg	gcctctgctg	24180
gtacacacac	aaacacacac	actgcacata	tataatatgt	aagcaaaact	tttatataca	24240
taaaataata	aatctcttaa	aacagaagaa	aatagggtca	cagcatctta	gttactgttc	24300
tgtggctgtg	aagagaccca	tgacaaaaac	agctcttact	aaagaaagca	tttaatttgg	24360
ggcttgcgta	cagttttaga	cgggttaagca	ctgctcatca	tgacaggaag	cagtctggca	24420
agggacagta	gctgagaact	ttatatcctc	acagtagcag	gcagagaaa	ataaggcctg	24480
atatgggctt	acagtacaaa	acctccagca	ggccacacct	cctaattcctt	cccaaacgct	24540
tccactaact	gatgggcaag	cattcaaaca	tatgagcagc	attctcattc	aaaggttcac	24600
acacacttta	tctttcctct	gaacatttgc	aatgatgttc	tgcccacctc	agcctcatga	24660
aagccagcag	agcagcaagc	ttgtgtcata	ctctaaccce	tccactggag	caatgacttg	24720
acttctactc	tggtgccag	gatggtactt	ggcattcaaa	ctgttggtag	atcacttttt	24780
gtgttctggc	ttctgagagc	tggttattaa	agcacaggct	tcaagtgatt	tttgaagaca	24840
aaagttagat	cttaacagaa	gtcgggcag	atgtgtgcc	ttccagctct	ggtactcaga	24900
ctgaggcagg	gagatcagcc	agcctacact	accacccat	agcacgtaga	gtggatcaga	24960
ttaggttgtt	tatgttggtg	tttgtgatgc	tgaggatgca	actgagcatg	ctgggtaagc	25020
actgtaccac	taagcaatgt	ccccagcctc	ttaaatcagt	ttctaacttg	aaaaacagac	25080
ttgaggtggt	aaagtgtctt	ctagatgttt	tccaggaaaa	caaatgcagc	atacgagctg	25140
gcagagggtt	cctggacagc	ttggctgacg	atctctaaac	gccagctgt	cagtgtgcag	25200
aatgcttagt	ctagttgctc	ttgtgttgat	tagtatggct	tgacgctaag	cagcatctga	25260
ggacatggct	gttgacact	cagggtctaa	ccatggcacc	cacacgcca	tggtctcctg	25320
aaaataacat	ctgcgctttg	cttttagctt	aggataat	tcttcatgta	gaatagtttg	25380
gcagtattac	ctatcttggt	tagatcaaaa	caaaacacaa	aattagtcgt	tcttgatggg	25440
ccagttaatt	ggaaaaaggc	acaagctggt	ctctgggtta	gaaaaagcca	ttctaccagc	25500
gaaatacacc	aaacatcaac	actgaaacaa	gcctcttgag	ttacagacag	aaataagtcg	25560
gctatgggta	acttagcttt	tttcttatgt	tagattgaaa	atgttcccc	gactggagt	25620
gtcatctgtg	atggagtggg	tagagtgggt	gaggttttat	ggtttttatc	ttgggacttg	25680
ctctgcattt	gtgtccaaga	taaatgatga	aatcatctgg	ttttgttaact	tatagcattg	25740
gaatttacta	tttcaagcag	atgatttaat	taggatcatg	gcattttttt	tacagtgtgg	25800
cccagaacga	cagtgtcttt	gattttcata	aatagaaagc	gggtcacata	tgtcatacta	25860
cattttcttt	tcttaagggt	ttgtttgttt	tggtttttgt	tttttagatg	gggtctctgt	25920
gtagttctgg	ctttcttgga	actcactatg	tagactaggc	tggcctcaaa	ctcacagata	25980
tctgactacc	tctgtctccc	aagtactagg	attaaagata	tgacacatca	cacctggcat	26040
gttaaat	ctagtaactg	tattaaaaaa	aaaaaagaag	tggaagaat	aattttgata	26100
atgtataaaa	cctaacattt	ctaaaataat	atttcaacat	tgagatttgt	acatttattt	26160
ctttcactgt	tttcaaatgc	tgcatatatg	ggtgtgagcg	tccacacttc	cttggcccag	26220
tggccacagg	tggtgtgtgt	ctcccatgct	caacaacgca	atcttttggt	tcaatggagt	26280
cctgtgcagt	gatgtttaca	taaactgtca	tatagatttt	cttttgtgtt	tctttgtgca	26340
catgttcatg	catgtgtagg	tacatgtatg	tgacaggtcaa	agggcaaccg	tgggtgtcat	26400
tccttcgact	tttgtttgac	acagcatctc	attagcctga	aactttgcca	agtaggctag	26460
accaactggc	cattgaactt	ccagggtctc	acatgtctcc	acctcctatc	ttgccctcat	26520
tggcattatg	ggcacaccac	cacaccagc	tttttattaa	tatgtgagtt	ctaggaatcc	26580
aatctcaggt	ccccagcaag	catggtacca	actgaacctt	cttcccagct	tcaaatttgt	26640
atggactgct	atgtaagtca	ggtcctggga	accacaggac	aacagggaagc	ttttcatcta	26700
ggagaggctg	attctgactt	ggcctccatg	taagagggcc	ctgatagcct	ttggtgcctt	26760
actggggcac	tgacaggaga	ggcacagcgc	ttcaggctgg	agcatgtgtt	cctgcaggcg	26820

gctttttat	cacctaggg	ttgctgtaca	cataccactc	cctaattctg	ggctcttact	26880
catgggttatt	tttagacctc	cagtgttctg	gagagacatt	gtcatgagtg	gttagctggg	26940
tcgggttctc	gtagccgagc	gttggagtg	ggcagtcgcc	atctcaggat	taagttgttt	27000
acgtgggtatt	cagctctcct	tcctttctta	ccccagattt	agaaaaata	tattaaaatc	27060
tatttatata	aatgtatatt	tatataaata	attccttttg	ttgagtgggc	agagtcagg	27120
cacatggctc	ttgtccttgt	gagcctgccg	ctctgctctc	tgctcctcc	aagcaccggt	27180
ctgagccagt	gcaggtttcc	tgtctatagc	cgacaggtg	gcctggatgc	agcaggtgtg	27240
tgtgggaggg	aaggaaccga	accgacgtgt	gctggacagc	tgctgggcgc	tgtattctta	27300
gatgaggctt	taggaatatt	ccttcagcgg	ccccagaag	tgatcatctg	tattctagag	27360
accaggaaac	agaaatccag	aagaaggaaa	ccagccagct	tcacgtgaca	tttgcttaac	27420
cccgtttgac	ctctggtaga	gaataggctt	gttgttgtca	tttggtcagg	tttttagatt	27480
tattttat	atatgagtac	actgtagttg	tctttacata	cactaaaaga	tggcatcaga	27540
tcccattaca	gatggttgtg	agccaccatg	tggttgctag	gatttgaact	caggacctct	27600
ggaagagcag	ccagtgtctc	taacctctga	gtcatctctc	cagccctgg	cagttgtttt	27660
gttgttgaag	atgatgatgt	tgtttctttg	tttgtttttt	aaatttttta	ttttgtttta	27720
ttctaatgag	catttttccc	aaatgtacct	atgtgtacta	tgtgacttgt	ccagtgcctt	27780
cagcatcag	aagactctgt	cagatagatc	ctctggagct	ggggataagt	atactgtgag	27840
ccaccatatg	ggtgctggga	attgaacttg	gtcctctgca	agagcaacaa	gtgcattaaa	27900
ctactgaacc	agctctccag	cacatgtgct	ctctctcccc	ctgtgtatgt	gtgggaatgg	27960
aggtgggtgg	gaggggttag	ggctcaggct	ggccttgacc	tgtctgtcat	gatatacatg	28020
gagttctggg	attacaggca	tgagccgctg	tgccctggctt	caaagtagat	tctagaactt	28080
aaaatcacac	ctaattgtaa	cagaagaaat	tcgctggcag	ccttgaatgg	cagctcatgt	28140
ctgaaattca	agcacttagg	aggcagaggt	aggaaataac	aaggctagcc	tgagaccctg	28200
ttttagaaaa	tcaaggacct	ggagactagc	tcagtgggtg	agaacttgta	tagtggttga	28260
tccccagcat	caggagtggg	cagagctgtg	gtggtaggat	ttgtgaatgc	aaacacgtat	28320
tattcaaaag	actacaaaaa	acatacaagc	tccttttcag	agtcaccagg	gtatccccta	28380
tgagtacttg	tggtgaccac	atatatatatt	tggtttacag	tcgagacccc	tgactgcagc	28440
aggatggctc	agtggaaacca	gctgcagcag	ctggacacac	gctacctgga	gcagctgcac	28500
cagctgtaca	gcgacagctt	ccccatggag	ctgcggcagt	tcctggcacc	ttggattgag	28560
agtcaagact	ggtgagtcct	tcttgaaaac	tccttgactt	gggggggtta	gcattgagtc	28620
aggacacaac	ctgttcttag	ttcacacctt	actaacctt	tgatcagaca	tgtgagggca	28680
ggtgcggggg	aaggattggg	agaacagagg	taacttagtc	tcttaacgca	tctgttcaca	28740
gtgcatatga	cagcggcctc	tttgaccttt	gaaacagctt	gctggtagat	gttttgag	28800
caggtttgag	tctcacttaac	ttgggtgagat	ctctgcacat	tttgagtcta	gaacagttag	28860
atacagatgt	ttttcctttt	taaatctaag	aattctatgt	caggtagaaa	ttgggttcta	28920
ccacacacgt	ggcttcccct	ggtaaagagg	aggcatggga	tgaggaggga	actagaggca	28980
tagaggaaat	gccagctgtt	tacctactt	tagtgtattc	aggcccgtgt	gctagttctg	29040
gcctaagtca	gccctatctg	cgtgtgacct	agctttttcca	gaagacatac	ctgatttggt	29100
gatgggccaa	agaggtgtgg	atcacacctc	agcctggcat	tgctcattaa	gctaagaagc	29160
acttatagac	actagtctga	ctgaatacag	ggttggccaa	gaatttaagg	caaacaacct	29220
tatctgtcct	ttaaaaaaac	aaaaacaaaa	catttaccag	tatgtgtgca	cgtttgtata	29280
gattcaggcg	tgtgtgcatt	cgtgtatgcg	tgtaggccag	aagacaacct	caagtgtcat	29340
tcttaagaac	gccttttggt	ttcgttgaga	ctgagtcatt	cattgggtcca	gagttaacca	29400
attagggcag	accttcagga	tctatctctg	atgcccagcg	ctgggcttac	acgcagtgtc	29460
tactgtgccc	agcattttct	ttttttaatt	taaaatagat	ttttttaaag	atatatttct	29520
ggctatgttt	tctcttcccc	catctcctct	aagatcttcc	ctaactcccc	tcctacccaa	29580
atccacaccc	tttctctctc	tctctcacta	gaacacaaac	aggcactaag	aaacagtaat	29640
aagataaggc	aaacaaaactg	gaataagggtg	aatagacca	acagaaaaaa	aaaaagagcc	29700
aaagagaaag	tataagaatg	ataatatatt	tgccagcatt	tttatgtgag	ttctgtggat	29760
gggagctcag	gtcctcatcg	ctctcacggt	tgaaccaact	gcccagactg	catctgtcct	29820
ttcattgtca	tcatgttgtg	tgttgttttg	ttattgttgt	gtgtatatgg	tattggggca	29880
gcgcgtggac	atgcgcctgt	gtgcacgcgg	aggctagagg	gcagcttcat	gaagtcagtt	29940
ctctgctctc	taaggattaa	actaatgttg	ccaggtttcc	caaccaagaa	cttttatctg	30000
tggcgcctac	tcaccatccc	ctgtttttgt	tttgtttttg	ttttaagaca	aggtccttga	30060
gtctaggcta	gcctgctact	tgtgtcagtc	agctgagggt	cccttgaact	acttaccttc	30120
ctgcttctac	ctccaagtat	taggactgta	ggtgtgtgct	gccatactaa	ggtctgggtt	30180
tggtttttgt	ttgtttatga	gtcaaaaagt	cgggctgggtg	agatggctca	gtgagtaaga	30240
gcacccgact	gctcttccga	aggctcggag	ttcaaatccc	agcaaccaca	tggtgggtca	30300
caaccatcgg	taacaagatc	tgactccctc	ttctgggtgtg	tctgaagata	gctacagtgt	30360
acttacatat	aataataaat	aatcttttaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	gagtcaaaaa	30420
gtcttactat	atagcttaaa	actggccttg	ctcttactat	atagccagg	ctggcttcca	30480
actttcaatc	ctcttgccctc	agcttctcaa	gtagttctca	gattacatac	gttgaccac	30540
tagacttgta	tctgtgcctc	ttgctcaaat	atttttagtcc	tatagattat	aagaatgaat	30600
aacagtatct	ggaaacattc	tcatattaac	ctttaacctt	tttttttcca	tgctggggac	30660
caaagccaga	gccttgagca	cactaggcag	gtgtgtgtca	ctgagctaca	ccacctattg	30720

atggtactgt	tgatctgaga	atgagaaatg	gaaaatgatg	gatttggtat	gacatcagat	30780
gttataacaa	ccccctgatg	gtggattctg	ggggatatacg	tttttagagtc	ctattattac	30840
tgccctttgag	agaatgtcat	ccaaactggc	ttggaactct	ctaggtaggg	aaagctggcc	30900
ttgaactctt	gatcctcctg	tctccaccac	cccgtataca	gatgtgtgct	ctcacaaaac	30960
gctctccaaa	ttactcatgc	agcttacctc	ctcttcctag	ggcatatgca	gccagcaaag	31020
agtcacatgc	cacgttggtg	tttcataatc	tcttgggtga	aattgaccag	caatatagcc	31080
gattcctgca	agagtccaat	gtcctctatc	agcacaaact	tcgaagaatc	aagcagtttc	31140
tgcaagtgcg	gtgggaaatg	gatgtgagac	ggcagcccca	cagagtggag	tgctgatgtt	31200
cctgcccggga	agttttcctt	acttggtctaa	gtgacgcctg	tcttgtactc	taaatcaaag	31260
gagaagtaat	tagctccttc	tcaattccct	gtacactggc	cctgggcacc	attaccagaa	31320
attcacttct	tatgttacag	ttgcagcaat	aagcaagggc	ttaatgttat	tctgttataa	31380
aagcacacta	ttaacaccta	cttgtcatag	gcacatgact	ctcaggtcta	aatgttataa	31440
gttttagccat	taactgggta	ctcctgggta	aagtcagtca	tttccctata	aagtcaagtg	31500
acccacgggtg	ccaggatgac	ctcacacttc	tggcttctgc	catcacagag	gccacatgct	31560
cctgccttcc	cttccctccc	catggatttc	agtcagatgc	tgaagccttt	gatctgtggt	31620
ttcatggagg	ctctgaggaa	gtgacttaag	ttagccaagt	tactccaca	cctccttagc	31680
cggtatagc	ttcctactct	ccatcttgc	tacagagcag	gtatcttgag	aagccaatgg	31740
aaattgcccc	gatcgctggc	cgatgcctgt	gggaagagtc	tcgcctcctc	cagacggcag	31800
ccacggcagc	ccaggtgaga	gcaagaagaa	gcaaagtggc	gagcagggga	ctgggaagca	31860
agcgattgta	taaataagtg	gaacagtaat	ggtttagtgc	ctctgaagag	gagatcacta	31920
gactacatta	aagccctaaa	catacattga	aaatgacaaa	aaatttcata	cagtctctat	31980
tccactccca	accaacagtg	ttgttgaagg	gtgaacttga	gtcagatttc	ctgagggctg	32040
ggagttgagc	tgctcacacc	acatcctata	agtgaagtg	taggggcaga	accagggctg	32100
cctgcgtggt	ggcacacac	tcggagacat	attcccaacc	ccggattgtt	gatgttgggt	32160
atcggttct	tgctatgcat	agctgacttc	cagtttgga	taatcttct	gcctctgcca	32220
cccaagtgca	gggttttcgg	tgatgccacc	aaacttccca	cacgtccatt	tcttgttttc	32280
atcttcagct	tttgagatgg	agtcacagtc	tgataccag	ctgcctagaa	ccctgtgcgt	32340
gggtgagcc	ctttcaaacc	cacaccagtc	ccttgcctca	gtctctagtc	attgagattt	32400
taggcattgg	ccaccaggct	cagcttcctt	ttgagacaga	gtctcaatac	atacccccat	32460
atggtaaaact	ctagatcctc	ctgcctcagc	ctccctgtga	gccaccatgc	ctgatccaca	32520
gggacttccc	agtgcctgac	ccctgagtta	gaacttgga	gttggaagaa	cacacctccc	32580
tagcaatttg	tacggagctt	gagagactct	agaccactgc	ttggggaaca	tagaggtggt	32640
tttttagggac	aaagccttca	ttcttgccat	aggcaagttt	aggagatagg	agataggaga	32700
gggagggacc	cagctttggg	gctgggcact	gtgaaggtct	gtctgtagta	cttctttatg	32760
tcttatctta	cagggctgat	cccacagggg	aaaaatgtag	tggctgggtt	gtttttccaa	32820
gtcttctgag	actatagtct	ggcatccat	gagaagtggg	gagagcgcct	aagagcgcct	32880
gtctctaaaa	tgctgttca	gctctacttt	gggactcgt	ggtcgtagta	gagagaacag	32940
accagaagtg	agaggttgta	gaagcaaagg	tctgggctgg	aggacagacc	tggcttcagt	33000
tcctagcatt	caagaggttg	ctcacaacca	tctgcaattc	cagttccagg	gaatccaaca	33060
cccatttggg	caccaggcac	acatgctggc	aaaaacagcc	acacacataa	aatgaagtaa	33120
ataagtctta	agaatgaaa	acaaaaagaa	gtaaaaagcc	gtaaaaagcc	ggcagttgga	33180
acctgactgg	agcccttgac	cagtgcgatg	gggtgagggg	agtggttagc	tgtaggccca	33240
gggtgtgagc	atttctagct	ttgaaaactg	gatggataac	atctctcctt	atcatagtct	33300
tcaagatcct	caggctgctg	tcaggctatc	tggttgggtc	ttaaagcctc	tacttggttag	33360
tttctgctcc	cagcaaagcc	ccatcatttt	acctatgacc	ccttaaggca	ttagcctctc	33420
cgggtctggg	agaagccttg	gaagcacaat	tttaaaagtc	cctgggaaat	gttttttcat	33480
ggaaatatgt	tacactttgt	tgtcatcagt	tcttaattta	tttattaata	ttctctgagc	33540
actgggatca	agcctgggct	tcactcattt	aggcaggatc	tccagtactg	agctgtacc	33600
cagctctttc	tagatttttt	tttttttttt	tgacagttta	cctttaggct	gcttgaagga	33660
tgaggcatct	tagttcaaca	tgtgggctcc	tggtttaatg	tggagaatgg	gtttgcatg	33720
tttctgttg	ataaaaagcc	agtggcacag	agagaacagt	gcaagcacc	tcacagcacc	33780
ctcccccttg	gatgggatgg	agctcagacg	agagggttcc	acaaatccat	gtgtgtgcta	33840
atcttagtta	tttattattt	atctatttat	tggcagcaag	ggggccaggc	caaccacca	33900
acagccgccc	tagtgacaga	gaagcagcag	atgttggagc	agcatcttca	ggatgtccgg	33960
aagcgagtgc	aggtaatcgg	gcctcaccca	gggagccg	ctgtgctgtg	cggctgcaga	34020
gtgtggtcct	gcgtgcacgc	tttcattatc	ttcaaaactt	tcttttccct	ttttcccaaa	34080
ggtaacctgt	gttttacttc	tgtttttggt	tggtttgttt	gttttaaacag	gatctagaac	34140
agaaaaatgaa	gggtggtggg	aacctccagg	acgactttga	tttcaactac	aaaaccctca	34200
agagccaagg	aggcaagcga	gctgtgggga	cgggagcagc	tgtgcaaggc	tacgcctgt	34260
cactgagctc	cagggcctgc	cttccatggg	aggaggagga	gctgctggcc	cttcacggga	34320
caatttttgc	attgtttgtt	tttgagatgg	gatttgacca	tgtagctctg	gctgaccgtg	34380
agcctacaac	catcttactt	cagctctctg	agtggccggg	actgcaggcg	cacagatggt	34440
gtagagcctt	gttaagaagg	ctgtggtgag	tccctctgct	caaggagtct	ttcctccttc	34500
ccttagacat	gcaggatctg	aatggaaaca	accagtctgt	gaccagacag	aagatgcagc	34560
agctggaaca	gatgctcaca	gccctggacc	agtaagcgag	agtaagcgat	ctggatgctt	34620

cctgagcatc gcacgcctag cgtggaagac agttttctgat ggctttctttc tctagaactg 34680
 actagagact gcggttagac atgggctggg gtaatgtgtt ctgacttggg tttggtttcc 34740
 aaacagagca ttgtgagtga gctggcgggg ctcttgtcag caatggagta cgtgcagaag 34800
 aactgactg atgaagagct ggctgactgg aagaggcggc agcagatcgc gtgcatcgga 34860
 ggccctccca acatctgcct ggaccgtctg gaaaactggg aagagttgga agaaaggctt 34920
 ctttttcttt agtcacgggc ctgcaagggg gggtggggggg gcgggggcgg agcggggcgg 34980
 agggggggca tgctgctccc tcgccatgct tttgcttttg cttttgcttt tgctttttca 35040
 tgctgggggtg gatgtgtggg agacaagtgt gccagagcca ctggactaca ctctagtgc 35100
 tggacactat tgctaagatg gcaccttttt ttttctttga gaaagaatct cactgagctg 35160
 cataggctgg ccctcatacc cactccatag ccagggctgg ccctcatacc cactccatag 35220
 ccagggctgg ccctcatacc cactccatag ccttgaattt gcaatcctcc 35280
 tgcttcatct tcccaaattg aattatctgg gattataggc atgcatcact ctgcctgcct 35340
 taaggtggcc ttttttacac agtcaagttt agtccaagaa ttaaaacctt tacctaattt 35400
 taactttttt gtttttttct gagacagagt ttctctatct agccttagct gtcttgaac 35460
 ttgctctgta gactacactg gctcaaactc atagaggctt gcctgcctct gcttcccaag 35520
 tactgagatt aaagacatgc accaccattg cccaaccaac aaatttttaa ttaaaaagaa 35580
 taaatttaata aagcttagat cactaattta agatatttaa ataactttt cagttgtatt 35640
 taacactaaa ttctccattt tagttatttt aataatctaa aacaatataat gttatttgca 35700
 aaggggggaa ataactgaat atatatataa ctaataaaat gaaataaaaa aaatgaaaat 35760
 ctagtctttg agtagtacca gcaagtcacc agactttgtg atagtcattt tgtaggcac 35820
 tgtcgtgatt aaacatgtga tttcatgact atacatgtga tgtcataact atacatgtga 35880
 agctagaaat cgagttgttc gtctccttcc tcccttctct ccttcttctc ttcctttgtt 35940
 gtgggtggat gtagtgcctc ggggtccctt ccttcagtct cctgagtgt gggtgcacca 36000
 ctaggggaca gaggtgactg gaacttctct ccattatggc aggataactt cattagcaga 36060
 atctcaactt cagaccgcgc aacaaattaa gaaactggag gagctgcagc agaaagtgtc 36120
 ctacaagggc gacctatctg tgcagcaccg gcccatgctg gagggagagga tctgtggagt 36180
 gttcagaaac ttaatgaaga ggtaacttgt aagagatgac gttccgaagg gaggaaccgg 36240
 cagaagactg gtcaccacag cgtctgagat gccatccttt tcccttccag tgccttctgt 36300
 gtggagcggc agccctgcat gcccatgcac cgggaccggc ccttagtcat caagactggg 36360
 gtccagttta ccacgaaagt cagggtgggc tgtccttaca ctttgggtgg agttttgatt 36420
 gatgtccagt cctcttccct gaggatttta agggaaggaa gggtctgtgg tgccatagct 36480
 gaggggcccc attgggtgag agatgaagcc cactcctcac ctggctcaga acacgtgcag 36540
 tatttctcat tgaatgctt ttattgcctt ccogtgagaa gtctcttaca acttgcttca 36600
 catgcttagg catctcagta ctttctagct gaagggttag tgttcacttt taatgtcaga 36660
 gatgactctg cggaagtaga atttgggttt gtaaaaaata tatatatata tatatatata 36720
 tatatgcgtg cgtgcgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tttttcatct 36780
 agacaggctt ttgtagccct ggctggcctg gaacactctc tgtaaactag gctggcttga 36840
 acccagagat tcacctccct ttgcctccca agtgcctggg ttaaaggcat gcaccacct 36900
 gctcagcaat attttacat cttaggaatt gaagtattag ggggtttata ttttaacgag 36960
 atcaaggtag ggagcctact aactttcctt gactatattt tttaataggg tgctgggtcaa 37020
 atttctctgag ttgaattatc agcttaaaat taaagtgtgc attgataagt aagtattctt 37080
 tatgtgtgtg tgtgtgtgaa tgtataattt ttattattta aaagcaactg ttaaattcat 37140
 gctttgctca tattcttccc ttctcccaag tacattcaga tctcctcctc ctgtactcac 37200
 ccaagtttct caaaaaaact aaacaaccaa accccaata caaaaaaatc cccaaaagac 37260
 tgagacaata atacaacacc caaaaagaaa aaagatggga ctaaaattgt gattaaataa 37320
 gagcatgcac aacaaactat ttgttgggtc actgtcctgc tcacgagacc cgcactgagt 37380
 ggttgacaaa gccagtgtg ctcccagcag ctccattgct aatctttcac cctagtgggt 37440
 gggttacatt cattcattca ttcatcatt ttttttaatt taacaaaata aaatataaca 37500
 aagcaaaaaca aaggctatga catccaagtt ggacgagaca aaccaacagg aggaaaagaa 37560
 cccaagagaa ggcacaggag tcggagtcct actcgtttgc accctgggaa tcccatgaga 37620
 aactacatg ggaagccaga atattagcac agaggccctg gtgcaggccc ctgcaggccc 37680
 agggcatgct gctccagtct ctgcaggttc atatgagctt tgctcgtggg gattcagagg 37740
 gccttgtggg tttgggtgacc tctaaccctt ctgggtctta atgtttttt tgctgcttct 37800
 tccttgggtat tccctgagct ctgagggggg ggatttgctg gagacatccc atttagggaa 37860
 tgagtgtttc aagggtcttt tctgcatgat gtctggctgt ggggtctctat atttcttccc 37920
 atctttggac agggaggactc ttctctgatg atggctgagc aaggcactga tatctgagtc 37980
 tagcagaatg tcacctggag tcattttatt gttttttttt cctttctctt ttttagatca 38040
 gtattattta gtttttccct aggtccttgg gctatctagt ctctgggtct tggccacca 38100
 agccttgttg ggtatgagtt tcatcttcta tagtgagcct taagactcct gttgggtggg 38160
 tacttccaca ggtttgtgcc accattgccc tagcatatcc tgcaggcagt acactattac 38220
 agatagagg cttaggctgg cttgctgttc acactctct tttgatagca tgcagagtag 38280
 cttcctataa caaagactct ggcatacagt ggggggctct atggaggcac cagcttcacg 38340
 tgcccatgtt cagtgaagtt tgtaggtgtt atcctcaaca gtggggcctt gctgtcagtt 38400
 gtggaaagca accgatgggt ttgataacag cgtggattgt ttgaggattt cttttggcca 38460
 acaattcaat tagacttaac cctaaccag tactggaagc tttatttggg ggcaagagat 38520

cgccagttgg	gaccccaact	ctccccatt	acttggcgat	tgaatctaga	tcaccttcac	38580
atatgtgaat	gttttaggag	gttcctactg	tacgagatgt	cgatactact	ccacggatgc	38640
tccataagtg	ttgccgtctc	ccattgttcc	ctcccaccac	cagctctcct	ctcccctcgg	38700
cttccccatt	tgctcctcca	agttcagacc	tcgtctatcc	agaatccctc	atctatccag	38760
aatccctcat	ctatccagaa	tccctcatct	atccagaacc	ccttctattt	cttttttcc	38820
aattagatct	atttgttctc	tgtagttcct	tagtctgtat	tcaccctctg	tggttcttaa	38880
ggattgcagc	ttggttatca	ttgacttaat	ggctaataatc	catacataag	tgagtacaca	38940
ccacatttgt	ctttctgggt	ctaggttacc	tcactcagga	agattttttt	tttcctagtt	39000
ccatctatct	gcctgcaagt	ttcttttttt	tttttttaat	ggctgagtaa	tactccgtat	39060
gtaaagtac	cacattttct	ttattcattc	ttctgttgag	ggacatctag	gttgtttcca	39120
gcttctgggt	agtatggaga	gaacagcagt	gaacgtgggt	gagcaagtgt	ctgtggtagg	39180
atgaagcatc	ctttgggtat	gtgcccaaga	gtgggtctaac	tggtatctga	ggtagatgga	39240
ttcccgctct	cctgaggagc	ggccatactg	atctccatag	ttgctgcatg	agcttgcat	39300
cccaccagca	atatgtgatg	gtggccctta	ctccacatcc	tcgacagcat	gagctgtcac	39360
ttgtgttgat	cttaactatc	ctggttaggca	tatgatagac	tctcacagca	gtttgatttg	39420
cattccctga	tcctaaggat	gttgacattt	tctctgtttc	tcagccactt	gggtttccct	39480
tattaaagaat	tttctgttta	gatctgtacc	ccatttctaa	ctggctgtga	tttcttgat	39540
atctattttc	ttaaaattct	tttcgggcat	ttgtcctcta	ttggatatgt	agttggttta	39600
aaagaaaaat	cccgttctgt	aggctaccaa	tccgtattct	taagcctaac	tcttgttttc	39660
aatgagggga	tggagaagca	agaacttgga	cagacatttg	acttttagaga	tgtctccatt	39720
cagggatctt	ctttttgtga	acagctgtgt	tcaaaaccct	tgcaaaaccct	gcccgggttg	39780
cctgaagcat	tgaaaagaaa	agtttgagtg	tgtgcagctc	agtattgcag	gctcacctag	39840
cacgcacgca	tgacagaggc	ccgggttcaa	ccccatact	gaaaaataaa	cgtgtaata	39900
agtaatgctt	gaaaatagag	tatatggaaa	gagaactggg	ttgaagttaa	taatcttctt	39960
ccacaaacct	accaacacat	gctatttgta	ggtaaaaata	tagcaatgga	aaagaaattt	40020
tacttagttt	tattttgaga	gagcgtctga	ctctacaacc	ctggctggcc	ttgaattcac	40080
agtgactcac	ctgcctgtgc	tccccagtg	taggattaaa	ggatctgac	accaagtctg	40140
gctaagaaga	acttgtaaaa	tagtggtctg	aaataagata	aagacagaaa	tgtcataata	40200
taaaaagatg	gcctgtcaga	gacaggcagc	agtggtcacg	tgaggatagc	atttccagct	40260
gccttgtggg	aggtgggtgc	agtttttgg	aacaacatac	ctttctggaa	aaccagcgt	40320
ggctccgata	ataaggaaat	tcaccacccg	tgtaactgga	aatgcagttg	gggcaagtac	40380
ctaaggatga	ggctgggtgac	tcacaggtgt	cttcaggaac	cctgggtctt	ccatgccatc	40440
cttaccgtgc	catccttacc	gtgccagctg	tagacaggtt	cccttccagg	tggtctcatg	40500
gctgtggaca	gaagatcagc	ctaggctatt	gcctccttgg	tctggctgag	aacaggcctt	40560
taatcccagc	accagggagg	cagaagcagg	tgatctctga	gttcaggtct	acagagcaag	40620
ttccacgaca	gccaggaggg	ctacacagag	cgctgtctcg	gaaagccgac	aaaacagaca	40680
aggcagaccc	cgtcttcacc	tgctctgtgg	cttctctctg	tctgatgaat	gcagtgatcg	40740
gggttccctg	gagatagatg	gctctgccat	cccttactga	gagaatggag	ctttccttag	40800
gaagggaag	aagctgtggg	taggccccca	gctaaggcta	ctgtttaaag	gcatacagag	40860
ttgtgtttca	caccgaaaat	gtaactgagc	atcgaaaggc	atgttccatc	agagttaggt	40920
ctggaaagaa	agaggggctc	taatctcagc	ttttattaac	ccttgtctgt	gttctttaca	40980
gagactctgg	ggatgttgct	gccctcagag	ggtaagttgg	gcctcctttt	gttctttctc	41040
atccaaactt	accctctggc	tactcagcgc	tcactgtgtg	ttgggttttc	tcccatgatt	41100
taggtctcgg	aaatttaaca	ttctgggcac	gaacacaaaa	gtgatgaaca	tggaggagtc	41160
taacaacggc	agcctgtctg	cagagttcaa	gcacctgggtc	gggtgctcag	gggagaggag	41220
gcggcacagg	ccaggtggca	gaggaggggg	gagagactgg	cacagcctca	agtgcacatt	41280
gcctccttct	tcttcttttc	ttccagaccc	ttaggagagca	gagatgtggg	aatggaggcc	41340
gtgccaattg	tgatgtaagt	aagttttgtt	cgggctaaaa	gcaattgttt	tctttctttg	41400
aggaagaaag	agaaagctct	ctcgtctctc	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	41460
ctctctctct	ctctcctctc	ctcctctctc	ccctctctcc	aaccagaaat	taaaacttta	41520
accctactact	ctcagatgtt	gtcctttaga	agcttgggtc	gctctgggcc	agggtgacat	41580
gctcagaagt	cacaggtgct	gtggagtttt	ctagcgagaa	acatttccct	gagtgttggg	41640
gagttggctc	cctttcagca	gtgggaagtc	cctcgccaag	ctgttaccct	cacctatctg	41700
gtagaaaaga	agtttccaca	ttgcccgggg	cttcccagag	tcccttgcta	ctacctgcca	41760
gctggctccc	ttttcagtgc	ctggtgagac	aaaaggaaga	catcaagtca	gccagtccga	41820
gctaacaaga	aaaaaaaaca	acaacaaaac	aaaacaaaac	aaaaaaaacc	accaacaaa	41880
ctgtgctcag	gagctgaggc	aggggaattg	tgagtttgag	atcattctgt	cattcagcac	41940
atacatgtaa	aagagctgga	aattcattcc	tgagaattca	tcagtaattt	gtgtactaat	42000
tgatgagggt	ctgtgggtccc	gtgcaggtcc	cagttcctct	ttcagagctg	tagagtattc	42060
tgtgcctac	accacagctc	atgaccacag	gtagccacat	tgtttgactg	cttgtgtggc	42120
actgaaggtt	atcacagtca	ctttagaaa	tgacttggca	taaaaatgag	cacaccctgt	42180
aaaccggcag	ttccagctct	aggaattaac	agtaagaaa	gctttgcata	ggtagaactaa	42240
ggacagataa	cacagtcaca	gccattgggtc	attgacacag	ctcagatctc	tcagcactgg	42300
gggtcatgagc	tgtgggtgtg	gcagtgaggt	actctacagc	tctgaaagag	gaactgggac	42360
ctgcacggga	ccacagaccc	tcatcaaggt	gggggtgggg	tgtcaggagc	aggaacacac	42420

tgagagtgc	gttcaactgtg	tgaagtacac	atgcttgagg	aaacaacccat	gaacacgggtt	42480
gggaggagct	gggagacagc	agagacaaag	acacagtaaa	gtgcagagaa	gggggattca	42540
cctgggggaat	ctcgggtgata	atggcaactt	atgcgggatg	ataatgctag	gctatcgctc	42600
agtgttgggg	tgcaacttaga	tgcatgagac	cctgagtttg	ctccctagt	catataaaag	42660
gaaggaggga	gagagagaag	aaacctaaga	agccttcctt	tattccttcc	tattctcccc	42720
tccttccttc	cctttctccc	tccttccttc	cctctctcct	ccctcctccc	ccctcctccc	42780
tctccctccc	tctccctctc	tcctccctct	ccctcccttc	ctctctctcc	cctccctccc	42840
ctcccttccc	tcttctctcc	tccttctcct	cctccttccct	ctttctctcc	cctccctcct	42900
tctccctccc	tcctccctcc	catcctccct	tcctccctcc	ctccctccct	ccctccctcc	42960
ctccctccct	ccctccctcc	ctccctccct	cccttccctc	cttccctcct	tccttccctc	43020
cttccctcct	tcttctgtgt	ctgtgtttgt	gtatggtcgc	acatgtgcga	tggtgtgaat	43080
gtgaagggtca	agttgccact	tgaaggagct	gtttcttctt	ccaccaagt	gggtcccagg	43140
atgagggtcg	gggtggcagg	cagatgccct	tgcccaactga	gccatcttgc	tggtccctcaa	43200
ataaggacgt	aagctgggtg	gcttatcctt	ggatgctcat	tgctttgtta	ttcttctgtc	43260
cttgaatgtg	tattgtaaga	tatggttatg	tactatgtag	tgcatatgtg	aggatcatgt	43320
ccttgggtct	ttgggtggaa	gaaagagggc	agagttgtgt	ccctgccagt	gtctctgaga	43380
gacctatgc	tgtttcagtc	ctccttgatc	gtgactgagg	agctgcacct	gatcaccttc	43440
gagactgagg	tgtaccacca	aggcctcaag	attgacctag	aggtagggcc	ttcccgaac	43500
caggcggctc	gtgtgctggg	gtgctgtgtc	agggaggcca	ggacagaacg	cctgccggga	43560
tgatgggtgt	ctgccagccc	tggattgtgt	tctcattatc	tatctcagaa	acgtccctga	43620
gagccaccct	gtccccaaga	gtaaagtctt	gcttgagtac	ctgttatgaa	aatctatatt	43680
agtgtattgt	tagaatcgat	ttgatgaagt	ttgggcaagt	gggtcttagt	agccgcctat	43740
tagattttat	tttctctgct	gcttgcttgc	ttgtttcctt	ccttccttcc	ttaaagattt	43800
atttatttta	tgtatgtgag	tacaccatta	ctctcttcag	acacaccaga	agaggggaat	43860
agattccatc	acagatgggt	gtaaagccac	catgtgggtg	ctgggaattg	aactcaggac	43920
ctcaggaaga	atagtccagt	ctcttaactg	ataggccatc	tctccagccc	ctgttttcca	43980
tctttcttga	tcttattaag	tttagacctg	gaaaagcaga	catccttagg	tttgatttct	44040
aacacctcag	cttcatggaa	agatgcagg	tggttggagg	ttgccttcca	gggtctgtct	44100
tggagagtcg	ggctgagggc	ctgggttagc	cttagtggtt	gggttagtgt	tagttgtttg	44160
tttgtttgtt	tttaaagggt	tgtttgttta	tttatttatt	atgagtgcac	tgtgggtgtc	44220
ttcagacact	ccagaagagg	gagtcataat	ttttttatgg	atggttgtga	gccaccgtgt	44280
gggtgtctgg	atgtgaactc	gggaccttcg	gaagagcagt	cagtgtctcat	aactgtctgag	44340
ccatctctcc	agccctagt	ttagttttta	gggcctgact	ttgaacaagt	cactgatgat	44400
gttcagacat	cagtgtctgt	gcaggctggt	cctgatgcag	gctggctcct	atgcaggctg	44460
gtcctgtatc	aggctgggtc	ttctcctcct	cttctctctg	ctccagcctg	cacttgccgt	44520
gaggggtggc	catggtgtga	tttttaattc	taacttattg	agatgcgggt	gacaagggtt	44580
gggagctgtg	agagcccagc	tgtcccacta	agtcattcac	cgctgtccc	catactctac	44640
agaccactc	cttgccagtt	gtggtgatct	ccaacatctg	tcagatgcca	aatgcttggg	44700
catcaatcct	gtggtataac	atgctgacca	ataaccccaa	ggtagtcttc	ccaccccaa	44760
ccctctctga	aatccctgaa	ccttgctgct	tctccacccc	cggtgcaggc	tgtcagtgtc	44820
actctctcat	ccaagtgggt	gcaggctgtc	agtgtcactc	tctcatccaa	gtgggtgcag	44880
gctgtcagt	tcactctctc	atccaagtgg	gtgcaggctg	tcagtgtcac	tctctcatcc	44940
aagtgaacaa	atgtgttctt	ttcaatagaa	cgtgaacttc	ttcactaagc	cgccaattgg	45000
aacctgggac	caagtggccg	aggtgtctcag	ctggcagttc	tcgtccacca	ccaagcgggg	45060
gctgagcatc	gagcagctgc	caacgctggc	tgagaagctc	ctaggttgac	agcttcagac	45120
atgtctggcc	tgggggggtg	tcatcagtc	gggttcccca	tgtcagccta	gggcaaggca	45180
ccatgccagg	accagggttg	taagtgtgtt	tgaagagcat	gtttctttct	ttaaaaagcc	45240
aaagacaata	gttttaaat	ttttctcccc	tttaaaaaaa	tatctggact	gaaagtaact	45300
ttgacctgtg	ctcctacaaa	aaaaaaaaaa	aaaaggctcc	tgacccagc	tgccagcttt	45360
gtcactgtgt	gttgccagtt	ctcagaccac	acaaggcaag	gacaagcagg	ggtccaacag	45420
gacctctgtg	ctggcctaatt	ctagggacag	ctgttggtgt	tggtgtgtgt	tggtcatgtg	45480
tggcacacac	cctgtaagta	catgtacaaa	tgcattggct	ttttgtaaat	tctgtttaag	45540
aaatagcttt	ggccaaggct	gaaatccggt	tgttgttttc	tcttccagg	cctggtgtga	45600
actactcagg	gtgtcagatc	acatgggcta	aattctgcaa	agtaagtgt	cctgttgatt	45660
ccctcagtta	ggaggtaggt	gtgggtgtcc	caggaccctc	ttctccagca	gctgtcagga	45720
gctgcctgag	gatagaggaa	cctgagggtg	taagaaggct	ctggcaggaa	agagctgggg	45780
tgagtgtgtg	tgggtgtgtg	ttccattctc	tttctccagg	aaaacatggc	tggcaagggc	45840
ttctccttct	gggtctggct	agacaatatc	atcgaccttg	tgaaaaagta	tatcttggcc	45900
ctttggaatg	aagggttaagg	ttaaactctg	cagtaaggct	gccctgtgta	acgagtcacc	45960
tactcccagc	aagcccgtga	ctggttgtcc	ttggctgcag	gtacatcatg	ggtttcatca	46020
gcaaggagcg	ggagcggggc	atcctaagca	caaagccccc	gggcaccttc	ctactgcgct	46080
tcagcgagag	cagcaaaagaa	ggaggggtca	ctttcacttg	ggtggaaaag	gacatcagtg	46140
gtaagaacgc	ttgctcctg	tatcacttgc	tccacctgct	ggccactggc	agcaccgggc	46200
tacttcatgt	tctgggtact	actgccccct	gaagggcaga	gagggcctgt	gcctcctgaa	46260
gaggtggcct	gccagtttgt	cctgttcaact	catttggcta	acatttgtgt	agaaaagtgt	46320

gattgaaatc	ttacttctgt	actcccttct	ctgcctaccc	cgtaataaca	tttgccggcag	46380
gtgtttttgc	ctatgagcca	gctggatctc	tacaagcccg	cctggatatt	gcctcagttc	46440
caagtcactg	ggcagggcat	tcagagtctc	cagcactcac	tccactggca	taatctctcc	46500
ttccatggtc	cgtgacaggc	aagaccacga	tccagtctgt	agagccatac	accaagcagc	46560
agctgaacaa	catgtcattt	gctgaaatca	tcatgggcta	taagatcatg	gatgcgacca	46620
acatcctggt	gtctccaactt	gtctacctct	accccgacat	tcccaaggag	gaggcatttg	46680
gaaagtactg	taggcccag	agccaggagc	accccggaagc	cgaccaggt	agttgttgac	46740
tttccatggc	tttgcccttc	ttcctagtga	gaaagtacgc	atccttggag	agacaaggac	46800
atggctgagt	atcttgtggg	agcagggcct	ggtgattcct	tcttttggga	aagagtgggt	46860
tattgggttc	cttgacaggg	tgactaactc	aggattcaag	aggaggacag	aatcagccct	46920
cagggagcct	ggaagtctga	agatgaaaat	agtatctctc	cctcttcctc	tcttctccct	46980
ttccatctcc	ccctccctcc	caccccgcca	ctttaaaaca	ctagaaagag	aatgaaggc	47040
aggtctctct	ggtgctcttc	cagtcagtgg	gttccagaag	acccgagaca	gatttgagtc	47100
cagcatgctt	tgctgtcctg	agtgagcagt	gccaggagtc	tgaagaaagg	ctttctgggg	47160
cagtggctgt	tggcagcctg	gggcagagct	gacatcaagc	tggaggtgtt	gatgttccag	47220
agatgatgac	tggagggaaat	gtggacttgg	catttagaaa	caagatgcat	ctactctgtg	47280
ggagtgcgtg	tggctgtaaa	tcagcatttc	tcagccttct	acggagcgct	taagactata	47340
ggaaaacaga	gatttccatt	atgattcata	actgtagcaa	aattacagct	atgaagtagt	47400
aagaaaaaagt	aatgtatggg	tggggctacc	acaacatgag	gagctgtatt	aaagggcat	47460
agcattcaga	aggttgagaa	ctgctggtat	aaattatatg	aaaaatagaa	attatgttgt	47520
gttaagtctg	tagtgtctgg	ggcggctcca	gtgtaaagag	tcagaggtgt	ctggctctgaa	47580
gccatttcaa	acttgttgca	ttgacgcttg	cctctgtcct	tatgctgggtg	aggagtctgg	47640
ttttctaaga	ctgttgttga	tcattgcaca	tgctgagctc	cgaggtgccc	tgtgtgagcc	47700
ggcctccttg	ctctgaggtg	ccctgtgtga	gcccggcctcc	ttgctctgag	gtgccctgtg	47760
tgagccggcc	tcctgtctct	gaggtgcctc	gtgtgagccg	gcctccttgc	tctgaggtgc	47820
cttgtgtgag	ccggcctcct	tgctctgggtg	tttttccacc	aaccgcttct	gttcacatag	47880
cacctgcaca	cagcttcccc	ggctctgccc	accattcttg	gaggagtccg	ttgttgacgg	47940
ttactttcct	ttccctttgt	tctgtctgtg	agttctcttc	attctgtgga	ggagtccagc	48000
tctcacttcc	tgtctgtccc	ttatctctgc	ttccaccttg	ccttcagttg	gaagatctgt	48060
ttatcagctc	ctctcacact	ggtcctttgt	cttttcacag	aggactttga	agtccgagca	48120
ctgatccttt	tgactaatgt	tgtcttcaag	atccaggccc	ctggtcaggc	atccacctcc	48180
atcaccattc	ctgttagagg	tgcccagaga	cattcctcag	gggcaaggcc	tgggcatgag	48240
aaaggagccc	actgcctgat	gggcttgccct	gtgagcctag	ggagagtga	ctgggggctc	48300
cggagcccga	tgatggaagg	gtaggggggt	cagatgatcc	ccttagggag	gtgagcctgt	48360
atgtccctgt	cctctgcccc	tgctacagga	gtattgcagt	agagacctcc	ccggagcctc	48420
gtcctgggtc	ttccttgtct	gtcaggaggc	tgtaatatatac	cctgtgctcc	tctggaggga	48480
ttttgagcaa	gttcaccagg	cagcaacagg	atgttccctc	tctcttccat	ctccagctgt	48540
tgtcccgcac	tcctacctcg	ggccgggtca	aagaatatatt	ctctcttgac	cactggagaa	48600
tgaaggtctt	ctcttctccg	ctctaactta	ttgtgtatgc	atgtgtgttg	gggggtggctc	48660
ttgttgagg	accttgagg	tgctcagctc	ctccttctac	catgtagccc	ctgaggacag	48720
agctcaggct	tggtagacaga	tgacttaagc	actaagccat	ctccctgate	ccctctgtct	48780
ctttaagggtg	acagttctct	ctctagagac	cttttctaga	actgtaggca	gcacagttgc	48840
ctcaataatt	cctttgcttc	tgtgctgagt	taacctgttt	cttggccaca	aatgagcttg	48900
catattcatc	taagagcact	ttctaattgc	ttctcccagg	ggtttgtctt	gctggatgct	48960
tgtaaagccc	agtgttctgt	ctgtgctttt	cttagcctac	ccacacagcc	ccaggcccgc	49020
tgcgagcatc	attaactgaa	cccccagggc	ttcatgccag	tgtccccagg	gcttccagat	49080
ttcttggcct	aacatttcag	tcctcacatt	tccaacataa	acggcagaga	tggagacag	49140
ccagtcctgt	ctctttctct	gtcccacaca	tgaaagagat	ggcgcccttg	ccaggtttcc	49200
tggctgttgc	acatgttttc	ggacctgggtg	tccgtctctc	cagtggcttg	ggtatgtttt	49260
cctgatttga	agtggctctc	gagcctccag	cactgtaagca	tttagtcctg	ttggtgtctg	49320
ggctgggtcac	caaacaggga	agtcaattca	caagtgtgac	caggtcacag	gagaagccta	49380
acgtacacac	aagatgggtg	gtcgctcagg	caggggtggg	aaggatgcac	aagagttggc	49440
ggtaggcgg	gcagtgggtg	tgcacacctt	taatcccagc	acttgggaag	cagaggcagg	49500
cggatttctg	agttcaagcc	cagcctgggtc	tacagagtaa	gttccaggac	agccagggct	49560
acacagagaa	accctgtctc	aaaaaaacaa	aaaacaaaaa	caaaagagtt	gacggtaggc	49620
tgggtagagg	tggggcagg	gtctctgcag	aagtccttgc	agctcaggaa	attctatgga	49680
agagatagaa	cttcaaatgc	caagactgga	tggcaagcag	catgtgatga	gggaggacag	49740
ccctaagagc	tggactgcgg	tgtctgggca	gtttctgtaa	ggttgggtca	cgccgtctgg	49800
gagaggcagg	aggattcctc	ttgcatgttc	tcaaagcaag	tcacaatctg	ttaaagccc	49860
ggtttccctc	ctgcagggtg	tgccccgtac	ctgaagacca	agttcatctg	tgtgacaccg	49920
taagtggccg	cccttcccag	tttcgcattc	atttctagt	tccatagtgtg	ctcagttgtc	49980
cccaggaata	gggaggacat	ggggtgagag	ttaccgtgaa	gggctggtag	ctgctgggct	50040
tgtttagtgc	tcagagtgac	cttgtgtgtt	taaaaagcct	gagtttttat	tttttctgtt	50100
ggagaccaga	gtttgatggc	ttgtgtgtgt	gtgtttgttc	tttttttttt	tccccctcca	50160
ttgtgtcttg	tcaacctggc	ccttcccact	cctgccgtcc	cccttttctc	acagaacgac	50220

ctgcagcaat	accattgacc	tgccgatgtc	ccccgcact	ttagattcat	tgatgcagtt	50280
tggaaataac	ggtgaagggtg	ctgagccctc	agcaggaggg	cagtttggtg	agtgtttgga	50340
gggtcaggcc	ccattgatgc	ttgcctgtac	agagccaggg	cctgccatcc	acactggtag	50400
aaatcggctc	tagagctggg	tgtggtggcc	caagcctgag	gcagaatgat	ccctccctgt	50460
gagttctgag	gccagcctgg	tctataaagt	gagtcagga	tagccggggc	tctattacac	50520
agagaaaccc	agtcttgaaa	aaacaaaaa	aaacaaaaa	tggctctagg	gccatgttct	50580
gctgtggaaa	tgatactcac	acacatgcag	tttcccagta	gccacagtaa	aagcagtaag	50640
agactttgac	agcttgggta	agcagcagcg	gcacttcagc	atctgagaaa	tcatggagct	50700
gtcctcccct	gtcccgcctc	ctctactgag	tctttgaaat	ggagtggctt	tgatgccttt	50760
gatttaggct	agtctcaggt	ggcagtgtgt	ggctaaggct	accacaccca	gggcagcctc	50820
agacccctga	aagagagagt	gagggctgag	gtggagactg	tgctcttctg	ggagggcaag	50880
gccctcctgt	gaggggcagg	aagtctggct	tttctgacct	tgtccatgtc	tgaagggaaca	50940
ggagactggg	ggttcctgag	ccctgtcctc	gtacagaggg	atgaggggtt	gtgagtcggc	51000
tttagtcagg	tggctgaact	gacactctct	gtgtgtctct	gcagagtcgc	tcacgtttga	51060
catggatctg	acctcgaggt	gtgctacctc	ccccatgtga	ggagctgaaa	ccagaagctg	51120
cagagacgtg	acttgagaca	cctgccccgt	gtccaccccc	taagcagccg	aaccccatat	51180
cgtctgaaac	tcctaacttt	gtggttccag	atTTTTTTTT	ttaatttcct	acttctgcta	51240
tctttgggca	atctgggcac	tttttaaaat	agagaaatga	gtgagtgtgg	gtgataaaact	51300
gttatgtaaa	cctctgagtc	tggggatggg	gctgagagca	gaaggagca	gaaggagca	51360
aggggaacac	ctcctgtcct	gcccgcctgc	cctccttttt	cagcagctcg	gggttgggtg	51420
ttagacaagt	gcctcctggg	gcccattggca	tctgtttgcc	ccactctgtg	agctgatacc	51480
ccaggctggg	aactcctggc	tctgcacttt	caaccttgct	aatatccaca	tagaagctag	51540
gactaagccc	agaggttcct	ctttaaatta	aaaaaaaaa	aaataagaat	taaaagggcaa	51600
aacacactga	cacagcatag	cctttccata	tcaaggaata	ctcagttaac	agcctctcca	51660
gcgctgtctt	caggctgac	atctatataa	accctggaat	ggttgagat	caaactctgta	51720
aaagagatcc	gagagctgtg	gcttggcctc	tggttcaaac	acaaaggcta	gagagaacct	51780
agatatccct	gggttttgtt	taccagtat	gcttgtcggg	tggaggtgtg	aggtaggcca	51840
agggcactgg	aaagcctttg	tcatcaccct	actccctccc	caaccagac	tccagacct	51900
gtttcagggt	cagcctgccc	tgtgggtgcc	ttactgggcc	taggggtcaac	ctgccttcc	51960
ttcccacttg	accttgctgg	t				51981

<210> 462

<211> 2951

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

10 <222> (156)...(2468)

<400> 462

cgctgaggta	caaccccget	cggtgtcgcc	tgaccgcgtc	ggctaggaga	ggccaggcgg	60
ccctcgggag	cccagcagct	cgcgcctgga	gtcagcgcag	gccggccagt	cgggcctcag	120
ccccggagac	agtcgagacc	cctgactgca	gcagg	atg gct cag tgg aac cag		173
				Met Ala Gln Trp Asn Gln		
				1	5	
ctg cag cag	ctg gac aca cgc	tac ctg gag cag	ctg cac cag	ctg tac		221
Leu Gln Gln	Leu Asp Thr Arg Tyr	Leu Glu Gln	Leu His Gln	Leu Tyr		
	10	15	20			
agc gac agc	ttc ccc atg gag	ctg cgg cag	ttc ctg gca	cct tgg att		269
Ser Asp Ser	Phe Pro Met Glu	Leu Arg Gln	Phe Leu Ala	Pro Trp Ile		
	25	30	35			
gag agt caa	gac tgg gca tat	gca gcc agc	aaa gag tca	cat gcc acg		317
Glu Ser Gln	Asp Trp Ala Tyr	Ala Ala Ser	Lys Glu Ser	His Ala Thr		
	40	45	50			
ttg gtg ttt	cat aat ctc	ttg ggt gaa	att gac cag	caa tat agc	cga	365
Leu Val Phe	His Asn Leu	Leu Gly Glu	Ile Asp Gln	Gln Tyr Ser	Arg	
	55	60	65	70		

ttc ctg caa gag tcc aat gtc ctc tat cag cac aac ctt cga aga atc	413
Phe Leu Gln Glu Ser Asn Val Leu Tyr Gln His Asn Leu Arg Arg Ile	
75 80 85	
aag cag ttt ctg cag agc agg tat ctt gag aag cca atg gaa att gcc	461
Lys Gln Phe Leu Gln Ser Arg Tyr Leu Glu Lys Pro Met Glu Ile Ala	
90 95 100	
cgg atc gtg gcc cga tgc ctg tgg gaa gag tct cgc ctc ctc cag acg	509
Arg Ile Val Ala Arg Cys Leu Trp Glu Glu Ser Arg Leu Leu Gln Thr	
105 110 115	
gca gcc acg gca gcc cag caa ggg ggc cag gcc aac cac cca aca gcc	557
Ala Ala Thr Ala Ala Gln Gln Gly Gly Gln Ala Asn His Pro Thr Ala	
120 125 130	
gcc gta gtg aca gag aag cag cag atg ttg gag cag cat ctt cag gat	605
Ala Val Val Thr Glu Lys Gln Gln Met Leu Glu Gln His Leu Gln Asp	
135 140 145 150	
gtc cgg aag cga gtg cag gat cta gaa cag aaa atg aag gtg gtg gag	653
Val Arg Lys Arg Val Gln Asp Leu Glu Gln Lys Met Lys Val Val Glu	
155 160 165	
aac ctc cag gac gac ttt gat ttc aac tac aaa acc ctc aag agc caa	701
Asn Leu Gln Asp Asp Phe Asp Phe Asn Tyr Lys Thr Leu Lys Ser Gln	
170 175 180	
gga gac atg cag gat ctg aat gga aac aac cag tct gtg acc aga cag	749
Gly Asp Met Gln Asp Leu Asn Gly Asn Asn Gln Ser Val Thr Arg Gln	
185 190 195	
aag atg cag cag ctg gaa cag atg ctc aca gcc ctg gac cag atg cgg	797
Lys Met Gln Gln Leu Glu Gln Met Leu Thr Ala Leu Asp Gln Met Arg	
200 205 210	
aga agc att gtg agt gag ctg gcg ggg ctc ttg tca gca atg gag tac	845
Arg Ser Ile Val Ser Glu Leu Ala Gly Leu Ser Ala Met Glu Tyr	
215 220 225 230	
gtg cag aag aca ctg act gat gaa gag ctg gct gac tgg aag agg cgg	893
Val Gln Lys Thr Leu Thr Asp Glu Glu Leu Ala Asp Trp Lys Arg Arg	
235 240 245	
cag cag atc gcg tgc atc gga ggc cct ccc aac atc tgc ctg gac cgt	941
Gln Gln Ile Ala Cys Ile Gly Gly Pro Pro Asn Ile Cys Leu Asp Arg	
250 255 260	
ctg gaa aac tgg ata act tca tta gca gaa tct caa ctt cag acc cgc	989
Leu Glu Asn Trp Ile Thr Ser Leu Ala Glu Ser Gln Leu Gln Thr Arg	
265 270 275	
caa caa att aag aaa ctg gag gag ctg cag cag aaa gtg tcc tac aag	1037
Gln Gln Ile Lys Lys Leu Glu Glu Leu Gln Lys Val Ser Tyr Lys	
280 285 290	
ggc gac cct atc gtg cag cac cgg ccc atg ctg gag gag agg atc gtg	1085
Gly Asp Pro Ile Val Gln His Arg Pro Met Leu Glu Glu Arg Ile Val	
295 300 305 310	
gag ctg ttc aga aac tta atg aag agt gcc ttc gtg gtg gag cgg cag	1133
Glu Leu Phe Arg Asn Leu Met Lys Ser Ala Phe Val Val Glu Arg Gln	
315 320 325	
ccc tgc atg ccc atg cac ccg gac cgg ccc tta gtc atc aag act ggt	1181

Pro	Cys	Met	Pro	Met	His	Pro	Asp	Arg	Pro	Leu	Val	Ile	Lys	Thr	Gly	
			330					335					340			
gtc	cag	ttt	acc	acg	aaa	gtc	agg	ttg	ctg	gtc	aaa	ttt	cct	gag	ttg	1229
Val	Gln	Phe	Thr	Thr	Lys	Val	Arg	Leu	Leu	Val	Lys	Phe	Pro	Glu	Leu	
			345				350					355				
aat	tat	cag	ctt	aaa	att	aaa	gtg	tgc	att	gat	aaa	gac	tct	ggg	gat	1277
Asn	Tyr	Gln	Leu	Lys	Ile	Lys	Val	Cys	Ile	Asp	Lys	Asp	Ser	Gly	Asp	
			360				365					370				
gtt	gct	gcc	ctc	aga	ggg	tct	cgg	aaa	ttt	aac	att	ctg	ggc	acg	aac	1325
Val	Ala	Ala	Leu	Arg	Gly	Ser	Arg	Lys	Phe	Asn	Ile	Leu	Gly	Thr	Asn	
					380					385					390	
aca	aaa	gtg	atg	aac	atg	gag	gag	tct	aac	aac	ggc	agc	ctg	tct	gca	1373
Thr	Lys	Val	Met	Asn	Met	Glu	Glu	Ser	Asn	Asn	Gly	Ser	Leu	Ser	Ala	
				395					400						405	
gag	ttc	aag	cac	ctg	acc	ctt	agg	gag	cag	aga	tgt	ggg	aat	gga	ggc	1421
Glu	Phe	Lys	His	Leu	Thr	Leu	Arg	Glu	Gln	Arg	Cys	Gly	Asn	Gly	Gly	
			410					415					420			
cgt	gcc	aat	tgt	gat	gcc	tcc	ttg	atc	gtg	act	gag	gag	ctg	cac	ctg	1469
Arg	Ala	Asn	Cys	Asp	Ala	Ser	Leu	Ile	Val	Thr	Glu	Glu	Leu	His	Leu	
			425				430						435			
atc	acc	ttc	gag	act	gag	gtg	tac	cac	caa	ggc	ctc	aag	att	gac	cta	1517
Ile	Thr	Phe	Glu	Thr	Glu	Val	Tyr	His	Gln	Gly	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	
			440				445					450				
gag	acc	cac	tcc	ttg	cca	gtt	gtg	gtg	atc	tcc	aac	atc	tgt	cag	atg	1565
Glu	Thr	His	Ser	Leu	Pro	Val	Val	Val	Ile	Ser	Asn	Ile	Cys	Gln	Met	
					460					465					470	
cca	aat	gct	tgg	gca	tca	atc	ctg	tgg	tat	aac	atg	ctg	acc	aat	aac	1613
Pro	Asn	Ala	Trp	Ala	Ser	Ile	Leu	Trp	Tyr	Asn	Met	Leu	Thr	Asn	Asn	
				475					480					485		
ccc	aag	aac	gtg	aac	ttc	ttc	act	aag	ccg	cca	att	gga	acc	tgg	gac	1661
Pro	Lys	Asn	Val	Asn	Phe	Phe	Thr	Lys	Pro	Pro	Ile	Gly	Thr	Trp	Asp	
			490					495					500			
caa	gtg	gcc	gag	gtg	ctc	agc	tgg	cag	ttc	tcg	tcc	acc	acc	aag	cgg	1709
Gln	Val	Ala	Glu	Val	Leu	Ser	Trp	Gln	Phe	Ser	Ser	Thr	Thr	Lys	Arg	
			505				510						515			
ggg	ctg	agc	atc	gag	cag	ctg	aca	acg	ctg	gct	gag	aag	ctc	cta	ggg	1757
Gly	Leu	Ser	Ile	Glu	Gln	Leu	Thr	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Leu	Leu	Gly	
			520				525					530				
cct	ggt	gtg	aac	tac	tca	ggg	tgt	cag	atc	aca	tgg	gct	aaa	ttc	tgc	1805
Pro	Gly	Val	Asn	Tyr	Ser	Gly	Cys	Gln	Ile	Thr	Trp	Ala	Lys	Phe	Cys	
					540					545					550	
aaa	gaa	aac	atg	gct	ggc	aag	ggc	ttc	tcc	ttc	tgg	gtc	tgg	cta	gac	1853
Lys	Glu	Asn	Met	Ala	Gly	Lys	Gly	Phe	Ser	Phe	Trp	Val	Trp	Leu	Asp	
				555					560					565		
aat	atc	atc	gac	ctt	gtg	aaa	aag	tat	atc	ttg	gcc	ctt	tgg	aat	gaa	1901
Asn	Ile	Ile	Asp	Leu	Val	Lys	Lys	Tyr	Ile	Leu	Ala	Leu	Trp	Asn	Glu	
			570					575					580			
ggg	tac	atc	atg	ggg	ttc	atc	agc	aag	gag	cgg	gag	cgg	gcc	atc	cta	1949
Gly	Tyr	Ile	Met	Gly	Phe	Ile	Ser	Lys	Glu	Arg	Glu	Arg	Ala	Ile	Leu	

585	590	595	
agc aca aag ccc ccg ggc acc ttc cta ctg cgc ttc agc gag agc agc Ser Thr Lys Pro Pro Gly Thr Phe Leu Leu Arg Phe Ser Glu Ser Ser 600 605 610			1997
aaa gaa gga ggg gtc act ttc act tgg gtg gaa aag gac atc agt ggc Lys Glu Gly Gly Val Thr Phe Thr Trp Val Glu Lys Asp Ile Ser Gly 615 620 625 630			2045
aag acc cag atc cag tct gta gag cca tac acc aag cag cag ctg aac Lys Thr Gln Ile Gln Ser Val Glu Pro Tyr Thr Lys Gln Gln Leu Asn 635 640 645			2093
aac atg tca ttt gct gaa atc atc atg ggc tat aag atc atg gat gcg Asn Met Ser Phe Ala Glu Ile Ile Met Gly Tyr Lys Ile Met Asp Ala 650 655 660			2141
acc aac atc ctg gtg tct cca ctt gtc tac ctc tac ccc gac att ccc Thr Asn Ile Leu Val Ser Pro Leu Val Tyr Leu Tyr Pro Asp Ile Pro 665 670 675			2189
aag gag gag gca ttt gga aag tac tgt agg ccc gag agc cag gag cac Lys Glu Glu Ala Phe Gly Lys Tyr Cys Arg Pro Glu Ser Gln Glu His 680 685 690			2237
ccc gaa gcc gac cca ggt agt gct gcc ccg tac ctg aag acc aag ttc Pro Glu Ala Asp Pro Gly Ser Ala Ala Pro Tyr Leu Lys Thr Lys Phe 695 700 705 710			2285
atc tgt gtg aca cca acg acc tgc agc aat acc att gac ctg ccg atg Ile Cys Val Thr Pro Thr Thr Cys Ser Asn Thr Ile Asp Leu Pro Met 715 720 725			2333
tcc ccc cgc act tta gat tca ttg atg cag ttt gga aat aac ggt gaa Ser Pro Arg Thr Leu Asp Ser Leu Met Gln Phe Gly Asn Asn Gly Glu 730 735 740			2381
ggt gct gag ccc tca gca gga ggg cag ttt gag tcg ctc acg ttt gac Gly Ala Glu Pro Ser Ala Gly Gly Gln Phe Glu Ser Leu Thr Phe Asp 745 750 755			2429
atg gat ctg acc tcg gag tgt gct acc tcc ccc atg tga ggagctgaaa Met Asp Leu Thr Ser Glu Cys Ala Thr Ser Pro Met * 760 765 770			2478
ccagaagctg cagagacgtg acttgagaca cctgccccgt gctccacccc taagcagccg aaccocatat cgtctgaaac tcctaacttt gtggttccag attttttttt ttaatttcct acttctgcta tctttgggca atctgggcac tttttaaaat agagaaatga gtgagtgtgg gtgataaaact gttatgtaaa gaggagagca cctctgagtc tggggatggg gctgagagca gaagggagca aggggaacac ctctgtcct gccgcctgc cctccttttt cagcagctcg gggttggttg ttagacaagt gcctcctggt gccatggca tcctgttgcc ccactctgtg agctgatacc ccaggctggg aactcctggc tctgcacttt caaccttgct aatatccaca tagaagctag gactaagccc agaggttcct ctttaaatta aaaaaaaaaa aaa			2538 2598 2658 2718 2778 2838 2898 2951

<210> 463

<211> 2918

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

5 <221> CDS

<222> (173)...(2341)

<400> 463

```

acgagcccta accgcatcgc tgaggtacaa ccccgctcgg tgcgcctga ccgcgtcggc 60
taggagaggc caggcggccc tcgggagccc agcagctcgc gcctggagtc agcgcaggcc 120
ggccagtcgg gcctcagccc cggagacagt cgagaccct gactgcagca gg atg gct 178
                                         Met Ala
                                         1

cag tgg aac cag ctg cag cag ctg gac aca cgc tac ctg gag cag ctg 226
Gln Trp Asn Gln Leu Gln Gln Leu Asp Thr Arg Tyr Leu Glu Gln Leu
      5                10                15

cac cag ctg tac agc gac agc ttc ccc atg gag ctg cgg cag ttc ctg 274
His Gln Leu Tyr Ser Asp Ser Phe Pro Met Glu Leu Arg Gln Phe Leu
      20                25                30

gca cct tgg att gag agt caa gac tgg gca tat gca gcc agc aaa gag 322
Ala Pro Trp Ile Glu Ser Gln Asp Trp Ala Tyr Ala Ala Ser Lys Glu
      35                40                45                50

tca cat gcc acg ttg gtg ttt cat aat ctc ttg ggt gaa att gac cag 370
Ser His Ala Thr Leu Val Phe His Asn Leu Leu Gly Glu Ile Asp Gln
      55                60                65

caa tat agc cga ttc ctg caa gag tcc aat gtc ctc tat cag cac aac 418
Gln Tyr Ser Arg Phe Leu Gln Glu Ser Asn Val Leu Tyr Gln His Asn
      70                75                80

ctt cga aga atc aag cag ttt ctg cag agc agg tat ctt gag aag cca 466
Leu Arg Arg Ile Lys Gln Phe Leu Gln Ser Arg Tyr Leu Glu Lys Pro
      85                90                95

atg gaa att gcc cgg atc gtg gcc cga tgc ctg tgg gaa gag tct cgc 514
Met Glu Ile Ala Arg Ile Val Ala Arg Cys Leu Trp Glu Glu Ser Arg
      100                105                110

ctc ctc cag acg gca gcc acg gca gcc cag caa ggg ggc cag gcc aac 562
Leu Leu Gln Thr Ala Ala Thr Ala Ala Gln Gln Gly Gly Gln Ala Asn
      115                120                125                130

cac cca aca gcc gcc gta gtg aca gag aag cag cag atg ttg gag cag 610
His Pro Thr Ala Ala Val Val Thr Glu Lys Gln Gln Met Leu Glu Gln
      135                140                145

cat ctt cag gat gtc cgg aag cga gtg cag gat cta gaa cag aaa atg 658
His Leu Gln Asp Val Arg Lys Arg Val Gln Asp Leu Glu Gln Lys Met
      150                155                160

aag gtg gtg gag aac ctc cag gac gac ttt gat ttc aac tac aaa acc 706
Lys Val Val Glu Asn Leu Gln Asp Asp Phe Asp Phe Asn Tyr Lys Thr
      165                170                175

ctc aag agc caa gga gac atg cag gat ctg aat gga aac aac cag tct 754
Leu Lys Ser Gln Gly Asp Met Gln Asp Leu Asn Gly Asn Asn Gln Ser
      180                185                190

gtg acc aga cag aag atg cag cag ctg gaa cag atg ctc aca gcc ctg 802
Val Thr Arg Gln Lys Met Gln Gln Leu Glu Gln Met Leu Thr Ala Leu
      195                200                205                210

gac cag atg cgg aga agc att gtg agt gag ctg gcg ggg ctc ttg tca 850
Asp Gln Met Arg Arg Ser Ile Val Ser Glu Leu Ala Gly Leu Leu Ser
      215                220                225

gca atg gag tac gtg cag aag aca ctg act gat gaa gag ctg gct gac 898
Ala Met Glu Tyr Val Gln Lys Thr Leu Thr Asp Glu Glu Leu Ala Asp
      230                235                240

```

tgg aag agg cgg cag cag atc gcg tgc atc gga ggc cct ccc aac atc	946
Trp Lys Arg Arg Gln Gln Ile Ala Cys Ile Gly Gly Pro Pro Asn Ile	
245 250 255	
tgc ctg gac cgt ctg gaa aac tgg ata act tca tta gca gaa tct caa	994
Cys Leu Asp Arg Leu Glu Asn Trp Ile Thr Ser Leu Ala Glu Ser Gln	
260 265 270	
ctt cag acc cgc caa caa att aag aaa ctg gag gag ctg cag cag aaa	1042
Leu Gln Thr Arg Gln Gln Ile Lys Lys Leu Glu Glu Leu Gln Gln Lys	
275 280 285 290	
gtg tcc tac aag ggc gac cct atc gtg cag cac cgg ccc atg ctg gag	1090
Val Ser Tyr Lys Gly Asp Pro Ile Val Gln His Arg Pro Met Leu Glu	
295 300 305	
gag agg atc gtg gag ctg ttc aga aac tta atg aag agt gcc ttc gtg	1138
Glu Arg Ile Val Glu Leu Phe Arg Asn Leu Met Lys Ser Ala Phe Val	
310 315 320	
gtg gag cgg cag ccc tgc atg ccc atg cac ccg gac cgg ccc tta gtc	1186
Val Glu Arg Gln Pro Cys Met Pro Met His Pro Asp Arg Pro Leu Val	
325 330 335	
atc aag act ggt gtc cag ttt acc acg aaa gtc agg ttg ctg gtc aaa	1234
Ile Lys Thr Gly Val Gln Phe Thr Thr Lys Val Arg Leu Leu Val Lys	
340 345 350	
ttt cct gag ttg aat tat cag ctt aaa att aaa gtg tgc att gat aaa	1282
Phe Pro Glu Leu Asn Tyr Gln Leu Lys Ile Lys Val Cys Ile Asp Lys	
355 360 365 370	
gac tct ggg gat gtt gct gcc ctc aga ggg tct cgg aaa ttt aac att	1330
Asp Ser Gly Asp Val Ala Ala Leu Arg Gly Ser Arg Lys Phe Asn Ile	
375 380 385	
ctg ggc acg aac aca aaa gtg atg aac atg gag gag tct aac aac ggc	1378
Leu Gly Thr Asn Thr Lys Val Met Asn Met Glu Glu Ser Asn Asn Gly	
390 395 400	
agc ctg tct gca gag ttc aag cac ctg acc ctt agg gag cag aga tgt	1426
Ser Leu Ser Ala Glu Phe Lys His Leu Thr Leu Arg Glu Gln Arg Cys	
405 410 415	
ggg aat gga ggc cgt gcc aat tgt gat gcc tcc ttg atc gtg act gag	1474
Gly Asn Gly Gly Arg Ala Asn Cys Asp Ala Ser Leu Ile Val Thr Glu	
420 425 430	
gag ctg cac ctg atc acc ttc gag act gag gtg tac cac caa ggc ctc	1522
Glu Leu His Leu Ile Thr Phe Glu Thr Glu Val Tyr His Gln Gly Leu	
435 440 445 450	
aag att gac cta gag acc cac tcc ttg cca gtt gtg gtg atc tcc aac	1570
Lys Ile Asp Leu Glu Thr His Ser Leu Pro Val Val Val Ile Ser Asn	
455 460 465	
atc tgt cag atg cca aat gct tgg gca tca atc ctg tgg tat aac atg	1618
Ile Cys Gln Met Pro Asn Ala Trp Ala Ser Ile Leu Trp Tyr Asn Met	
470 475 480	
ctg acc aat aac ccc aag aac gtg aac ttc ttc act aag ccg cca att	1666
Leu Thr Asn Asn Pro Lys Asn Val Asn Phe Phe Thr Lys Pro Pro Ile	
485 490 495	

gga acc tgg gac caa gtg gcc gag gtg ctc agc tgg cag ttc tcg tcc Gly Thr Trp Asp Gln Val Ala Glu Val Leu Ser Trp Gln Phe Ser Ser 500 505 510	1714
acc acc aag cgg ggg ctg agc atc gag cag ctg aca acg ctg gct gag Thr Thr Lys Arg Gly Leu Ser Ile Glu Gln Leu Thr Thr Leu Ala Glu 515 520 525 530	1762
aag ctc cta ggg cct ggt gtg aac tac tca ggg tgt cag atc aca tgg Lys Leu Leu Gly Pro Gly Val Asn Tyr Ser Gly Cys Gln Ile Thr Trp 535 540 545	1810
gct aaa ttc tgc aaa gaa aac atg gct ggc aag ggc ttc tcc ttc tgg Ala Lys Phe Cys Lys Glu Asn Met Ala Gly Lys Gly Phe Ser Phe Trp 550 555 560	1858
gtc tgg cta gac aat atc atc gac ctt gtg aaa aag tat atc ttg gcc Val Trp Leu Asp Asn Ile Ile Asp Leu Val Lys Lys Tyr Ile Leu Ala 565 570 575	1906
ctt tgg aat gaa ggg tac atc atg ggt ttc atc agc aag gag cgg gag Leu Trp Asn Glu Gly Tyr Ile Met Gly Phe Ile Ser Lys Glu Arg Glu 580 585 590	1954
cgg gcc atc cta agc aca aag ccc ccg ggc acc ttc cta ctg cgc ttc Arg Ala Ile Leu Ser Thr Lys Pro Pro Gly Thr Phe Leu Leu Arg Phe 595 600 605 610	2002
agc gag agc agc aaa gaa gga ggg gtc act ttc act tgg gtg gaa aag Ser Glu Ser Ser Lys Glu Gly Gly Val Thr Phe Thr Trp Val Glu Lys 615 620 625	2050
gac atc agt ggc aag acc cag atc cag tct gta gag cca tac acc aag Asp Ile Ser Gly Lys Thr Gln Ile Gln Ser Val Glu Pro Tyr Thr Lys 630 635 640	2098
cag cag ctg aac aac atg tca ttt gct gaa atc atc atg ggc tat aag Gln Gln Leu Asn Asn Met Ser Phe Ala Glu Ile Ile Met Gly Tyr Lys 645 650 655	2146
atc atg gat gcg acc aac atc ctg gtg tct cca ctt gtc tac ctc tac Ile Met Asp Ala Thr Asn Ile Leu Val Ser Pro Leu Val Tyr Leu Tyr 660 665 670	2194
ccc gac att ccc aag gag gag gca ttt gga aag tac tgt agg ccc gag Pro Asp Ile Pro Lys Glu Glu Ala Phe Gly Lys Tyr Cys Arg Pro Glu 675 680 685 690	2242
agc cag gag cac ccc gaa gcc gac cca ggt agt gct gcc ccg tac ctg Ser Gln Glu His Pro Glu Ala Asp Pro Gly Ser Ala Ala Pro Tyr Leu 695 700 705	2290
aag acc aag ttc atc tgt gtg aca cca ttc att gat gca gtt tgg aaa Lys Thr Lys Phe Ile Cys Val Thr Pro Phe Ile Asp Ala Val Trp Lys 710 715 720	2338
taa cggtgaaggt gctgagccct cagcaggagg gcagtttgag tcgctcacgt *	2391
ttgacatgga tctgacctcg gagtgtgcta cctcccccat gtgaggagct gaaaccagaa	2451
gctgcagaga cgtgacttga gacacctgcc ccgtgctcca cccctaagca gccgaacccc	2511
atatcgtctg aaactcctaa ctttgtggtt ccagattttt ttttttaatt tcctacttct	2571
gctatccttg ggcaatctgg gcacttttta aaatagagaa atgagtgagt gtgggtgata	2631
aactgttatg taaagaggag agcacctctg agtctgggga tggggctgag agcagaaggg	2691

```

agcaagggga acacctcctg tcctgccgcg ctgccctcct ttttcagcag ctcgggggttg 2751
gttggttagac aagtgcctcc tgggtgccat ggcacccctgt tgccccactc tgtgagctga 2811
taccaccaggc tgggaactcc tggctctgca ctttcaacct tgctaataatc cacatagaag 2871
ctaggactaa gccacagaggt tcctctttta attaaaaaaa aaaaaaa 2918

```

<210> 464

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador para PCR

10

<400> 464

gccacgttgg tgttcataa tct 23

<210> 465

15 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Cebador para PCR

<400> 465

gatagaggac attggactct tgca 24

25 <210> 466

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Sonda para PCR

<400> 466

ttgggtgaaa ttgaccagca atatagccg 29

35

<210> 467
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 467
 10 ctaaattctt agagatccac 20
 <210> 468
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 468
 20 cacactaatg caagatgcta 20

 <210> 469
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 30 <400> 469
 aaaaagtgat ctaccaacag 20

 <210> 470
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 470

caactcttac cagttttcca 20

<210> 471

<211> 20

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15

<400> 471

atcaatgaat ctaaagtgcg 20

<210> 472

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 472

cactgagcca tcctgctgca 20

<210> 473

<211> 20

30 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

35

<400> 473

agctggttcc actgagccat 20

<210> 474
<211> 20

5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

10

<400> 474
tgtgctgata gaggacattg 20

<210> 475

15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 475
agactcttcc cacaggcac 20

25 <210> 476
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 476
cagtcagcca gctcttcac 20

35 <210> 477

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 477

agttatccag tttccagac 20

10

<210> 478

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 478

20 tccagtttct taattgttg 20

<210> 479

<211> 20

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

30 <400> 479

tgtaggacac tttctgctgc 20

<210> 480

<211> 20

35 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

5 <400> 480
 actggacacc agtcttgatg 20

<210> 481
 <211> 20

10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 481
 tttaatttta agctgataat 20

<210> 482
 <211> 20

20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

25 <400> 482
 cacactttaa tttaagctg 20

30 <210> 483
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

	<400> 483	
	caatgcacac ttaatttta	20
5	<210> 484	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
10	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 484	
	gcccagaatg ttaaatttc	20
15	<210> 485	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 485	
25	ccctaagggt caggtgcttg	20
	<210> 486	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
35	<400> 486	
	ccattccac atctctgctc	20

<210> 487
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 487
 aaggatgatca ggtgcagctc 20

 <210> 488
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 488
 gggatctctag gtcaatcttg 20

 <210> 489
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 489
 caccacaact ggcaaggagt 20
 <210> 490
 35 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

5

<400> 490

ggtcagcatg ttataccaca 20

<210> 491

10 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 491

acttgggtccc aggtccaat 20

<210> 492

20 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 492

gacaccctga gtagtcaca 20

30 <210> 493

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 493
ccagccatgt ttctttgca 20

5

<210> 494
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 494
atgatattgt ctgcccagac 20

15

<210> 495
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 495

25 ccaagatata cttttcaca 20

<210> 496
<211> 20
<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido Antisentido

35 <400> 496
cttcattcca aaggccaag 20

<210> 497
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

 10 <400> 497
 ccaagtgaag gtagccctc 20

 <210> 498
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido
 20
 <400> 498
 actgatgtcc ttccaccc 20

 <210> 499
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> Oligonucleótido Antisentido

 <400> 499
 ggtcttgcc actgatgtcc 20

 35 <210> 500
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 500
 gactggatct gggcttgcc 20

10 <210> 501
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 501
 cacagatgaa ctgtgtctc 20

20 <210> 502
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 502
 30 gttggtgtca cacagatgaa 20

<210> 503
 <211> 20
 <212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 503

5 caatggtatt gctgcaggtc 20

<210> 504

<211> 20

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

15 <400> 504

caggtcaatg gtattgctgc 20

<210> 505

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

25

<400> 505

catcaatgaa tctaaagtc 20

<210> 506

30 <211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Oligonucleótido Antisentido

	<400> 506	
	aactgcatca atgaatctaa	20
	<210> 507	
5	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 507	
	ttccaaactg catcaatgaa	20
	<210> 508	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 508	
	gttatttcca aactgcatca	20
25	<210> 509	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido Antisentido	
	<400> 509	
35	aggtcagatc catgtcaaac	20

<210> 510

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

<400> 510

10 agtcctagct tctatgtgga 20

<210> 511

<211> 20

<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido Antisentido

20 <400> 511

atcaatgaat ggtgtcacac 20

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido de 12 a 50 nucleobases de longitud, que hibrida específicamente con una molécula de ácido nucleico que codifica STAT3 y es capaz de inhibir la expresión de STAT3, y en donde el oligonucleótido está direccionado a los nucleótidos 2983 hasta 3127 de SEQ ID NO: 154.
- 5 2. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1, en donde la molécula de ácido nucleico codifica STAT3 humana.
3. El oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación precedente, en donde el oligonucleótido es 100% complementario a la molécula de ácido nucleico que codifica STAT3.
4. El oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación precedente, el cual tiene:
10 13 a 40 nucleobases de longitud; o
15 a 30 nucleobases de longitud.
5. El oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación precedente, en donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos un enlace internucleósido modificado, tal como un enlace fosforotioato.
- 15 6. El oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación precedente, en donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos una unidad estructural azúcar sustituido, tal como una unidad estructural 2'-O-(2-metoxietilo).
7. El oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación precedente, en donde el oligonucleótido antisentido comprende al menos una nucleobase modificada, tal como 5-metil citosina.
8. El oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación precedente el cual es un oligonucleótido quimérico.
9. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 8, el cual es un oligómero con brecha.
- 20 10. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 8 o 9 el cual es un oligonucleótido quimérico que tiene una primera región que comprende desoxinucleótidos y segunda y tercera regiones que flanquean dicha primera región, comprendiendo al menos un nucleótido 2'-O-(2-metoxietilo).
11. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 10, en donde dicha primera región tiene diez desoxinucleótidos de longitud y dicha segunda y tercera regiones tienen cada una cinco nucleótidos de longitud.
- 25 12. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de cualquier reivindicación precedente y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
13. El oligonucleótido antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para uso en terapia o profilaxis.
14. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 13 para uso en el tratamiento o prevención de estados inflamatorios anormales o enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide.
- 30 15. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 13 para uso en el tratamiento o prevención de cánceres, tales como cáncer de seno, próstata, cerebro o cabeza y cuello, melanomas, mielomas, leucemias o linfomas.