

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 379**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2007** **E 11181596 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016** **EP 2444494**

54 Título: **Compuestos antagonistas de ARN para la modulación de PCSK9**

30 Prioridad:

09.10.2006 US 828735 P

17.09.2007 US 972932 P

04.10.2007 US 977409 P

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

27.02.2017

73 Titular/es:

ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN

A/S (100.0%)

Fremtidsvej 3

2970 Hørsholm, DK

72 Inventor/es:

STRAARUP, ELLEN MARIE y

NIELSEN, NIELS FISKER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 603 379 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

Compuestos antagonistas de ARN para la modulación de PCSK9

5 Campo de la invención

La presente invención proporciona compuestos, composiciones y métodos para modular la expresión de PCSK9. En particular, la presente invención se refiere a compuestos oligoméricos, tales como compuestos oligonucleotídicos, que son hibridables con ácidos nucleicos diana que codifican PCSK9, y métodos para la preparación de dichos compuestos oligoméricos. Se ha mostrado que los compuestos oligonucleotídicos modulan la expresión de PCSK9, y se desvelan preparaciones farmacéuticas de los mismos y su uso como tratamiento de hipercolesterolemia y trastornos relacionados.

15 Antecedentes

La proproteína convertasa subtilisina/quexina de tipo 9a (PCSK9) es un miembro de la subfamilia de subtilasas proteinasa K. El gen de PCSK9 (NARC-1) se ha identificado como un tercer locus implicado en la hipercolesterolemia dominante autosómica (ADH), caracterizado por altos niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL), xantomas y una alta frecuencia de enfermedad cardíaca coronaria. Los otros dos loci son apolipoproteína-B (Apo-B) y el receptor de LDL (LDLR). PCSK9 actúa como un inhibidor natural de la ruta de receptor de LDL, y ambos genes están regulados por agotamiento de contenido celular de colesterol y estatinas mediante proteína de unión a elemento regulador de esteroles (SREBP). Los niveles de proteína y ARNm de PCSK9 están regulados por consumo de alimentos, insulina y niveles de colesterol en células (Costet *et al.*, J. Biol. Chem. Enero 2006).

25 La secuencia de ARNm de NARC1 humano (ADNc), que codifica PCSK9 humana se muestra como SEQ ID NO 2 (NCBI n.º de ref. NM_174936).

La secuencia polipeptídica de PCSK9 humana (naciente) se muestra como SEQ ID NO 1 (NCBI n.º ref. NP_777596). El polipéptido tiene un péptido señal entre los restos 1-30, que se extiende cotraduccionalmente para producir una proproteína (31-692 de SEQ ID No 1), que se escinde posteriormente por una proteasa para producir una proteína madura correspondiente a los aminoácidos 83-692 de SEQ ID NO 1. Un sitio de glucosilación se ha caracterizado en el resto 533.

35 Park *et al.*, (J. Biol. Chem. 279, pp 50630-50638, 2004) desvelan que la sobreexpresión de PCSK9 redujo la proteína LDLR dando como resultado un aumento del colesterol LDL en plasma, y sugiere que un inhibidor de la función de PCSK9 puede aumentar los niveles de proteínas LDLR y potenciar la eliminación de LDL del plasma.

Rashid *et al.*, (2005, PNAS 102, n.º 15, pp 5374-5379) desvelan que ratones nuligénicos que carecen de PCSK9 manifiestan proteína LDLR aumentada lo que conduce a una eliminación aumentada de lipoproteínas en circulación y niveles de colesterol en plasma reducidos, y sugiere que los inhibidores de PCSK9 pueden ser útiles para el tratamiento de hipercolesterolemia y que puede haber sinergia entre los inhibidores de PCSK9 y estatinas para potenciar los LDLR y reducir el colesterol en plasma.

45 El documento WO01/57081 desvela la secuencia polinucleotídica de NARC-1 y desvela que pueden diseñarse ácidos nucleicos antisentido usando la secuencia polinucleotídica de NARC-1 y que dichos ácidos nucleicos antisentido pueden comprender nucleótidos o bases modificados, tales como ácidos nucleicos peptídicos.

El documento WO2004/097047, que desvela dos mutantes de PCSK9 que están asociados con ADH, sugiere que pueden usarse antisentido o ARNi de dichos mutantes de PCSK9 para el tratamiento de ADH.

50 Lalanne Florent *et al.*, J. Lipid Research, vol 46, n.º 6 pp 1312-1319 (2005) y el documento US 2004/009553 se refiere a moléculas de ARNi que reducen la expresión del gen de PCSK9.

55 Kurreck *et al.*, Nucleic Acid Research 30, pp 1911-1918 (2002) desvela el diseño de oligonucleótidos antisentido que contienen ácidos nucleicos bloqueados.

Objeto de la invención

60 La invención proporciona soluciones terapéuticas para el tratamiento de hipercolesterolemia y trastornos relacionados, basadas en oligonucleótidos antisentido, dirigidos contra ácidos nucleicos de PCSK9. Los inventores han descubierto que el uso de análogos de nucleótidos que tienen una afinidad potenciada por su compañero de unión complementario, tales como análogos de nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA), dentro de oligonucleótidos antisentido que se dirigen hacia ácidos nucleicos diana de PCSK9, proporcionan modulación altamente eficaz, particularmente la regulación negativa, de la expresión de PCSK9 (NARC1).

65

Sumario de la invención

La invención proporciona oligonucleótidos antisentido como se define en la reivindicación 1.

- 5 El oligonucleótido antisentido es de entre 10 y 25 nucleobases de longitud que consiste en o comprende una secuencia de nucleobases contiguas de un total de entre 10 y 25 nucleobases, en el que dicha secuencia de nucleobases contiguas es complementaria de una región correspondiente de una SEQ ID NO 2. El oligonucleótido antisentido no es un ARNip.
- 10 La invención proporciona además un conjugado que comprende el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, tal como un conjugado que, además de la secuencia de nucleobases del oligonucleótido antisentido comprende al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico unido covalentemente con el oligonucleótido antisentido de la invención.
- 15 El oligonucleótido antisentido puede consistir en una secuencia de un total de entre 10 y 25 nucleobases, que son complementarias de una secuencia contigua que está presente en SEQ ID NO 2.
- El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, es para su uso como un medicamento como se define en la reivindicación 15.
- 20 Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse en métodos para modular la expresión de PCSK9 en células o tejidos de mamífero que comprenden poner en contacto dichas células o tejidos de mamífero con uno o más de los compuestos oligoméricos o composiciones de la invención. Típicamente la expresión de PCSK9 se inhibe o se reduce.
- 25 Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse en métodos para tratar a un mamífero, tal como un ser humano, que se sospecha que tiene o es propenso a una enfermedad o afección, asociada con la expresión de PCSK9, tal como hipercolesterolemia o trastorno relacionado, administrando una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de otros compuestos oligoméricos o composiciones de la invención.
- 30 Se proporcionan los oligonucleótidos antisentido de la invención que pueden usarse en métodos para la inhibición de la expresión de PCSK9 y para el tratamiento de enfermedades asociadas con actividad de PCSK9, tales como hipercolesterolemia y/o trastornos relacionados.
- 35 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido o conjugado de la invención, y un diluyente, vehículo, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos oligonucleotídicos antisentido de acuerdo con la invención y compuestos adicionales capaces de modular los niveles de colesterol en suero sanguíneo, tales como moduladores de apolipoproteína B (Apo-B100), en particular oligonucleótidos antisentido (oligómeros) dirigidos a dianas de ácido nucleico de Apo-B.
- 40 Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse en un método para (i) reducir el nivel de colesterol en suero sanguíneo o ii) reducir el nivel de colesterol LDL en suero sanguíneo o iii) para mejorar la relación HDL/LDL, en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar el oligonucleótido antisentido o el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente.
- 45 Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse en un método para reducir los triglicéridos en plasma en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar el oligonucleótido antisentido o el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente de modo que se reduzca el nivel de triglicéridos en suero sanguíneo.
- 50 Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse en un método para tratar la obesidad en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar el oligonucleótido antisentido o el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente que necesite tratamiento de modo que se reduzca el peso corporal del paciente.
- 55 Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse en un método para tratar hipercolesterolemia, o un trastorno relacionado, en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar el oligonucleótido antisentido o el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente que necesite tratamiento para hipercolesterolemia, o un trastorno relacionado.
- 60 Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse en un método para tratar la resistencia a insulina en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar el oligonucleótido antisentido o el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente que necesite tratamiento de modo que se aumente la sensibilidad del paciente a insulina.
- 65

Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse en un método para tratar la diabetes de tipo II en un paciente, comprendiendo el método la etapa de administrar el oligonucleótido antisentido o el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente que padece diabetes de tipo II.

5 Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden usarse en un método para tratar un trastorno metabólico tal como síndrome metabólico, diabetes o aterosclerosis, comprendiendo el método la etapa de administrar el oligonucleótido antisentido o el conjugado o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención al paciente que lo necesite.

10 La invención proporciona el oligonucleótido antisentido o conjugado de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionado del grupo que consiste en: hipercolesterolemia o un trastorno relacionado, de acuerdo con la reivindicación 17.

Breve descripción de las figuras

15 La Figura 1 muestra una representación esquemática de la interacción de PCSK9 y el LDLr: PCSK9 altera la expresión del receptor de LDL (LDLr). LDLr se expresa en la superficie vasolateral de hepatocitos e interacciona con apoB-100, permitiendo de este modo la captación de LDL en plasma y posiblemente la de VLDL naciente. La internalización celular de apoB-100 que contiene lipoproteínas requiere la proteína adaptadora ARH (hipercolesterolemia recesiva autosómica). PCSK9 altera la expresión postraducciona de LDLr. Los genes *PCSK9* y *LDLr* están regulados positivamente con bajos niveles de colesterol intracelular, lo que indica que ambos genes son dianas indirectas de inhibidores de HMGCoA reductasa (estatinas) - (Lambert *et al.* 2006, TRENDS in Endocrinology and Metabolism, 17: 79-81).

25 Figura 2 Expresión de ARNm de PCSK9 en células Huh-7 24 horas después de la transfección con Lipofectamine y oligonucleótidos LNA compuesto ID n.º: 262 o 338 a 0,04, 0,2, 1, 5, 10 o 25 nM. Los datos están normalizados con respecto a Gapdh y se presentan en relación con el control de simulación.

30 Figura 3 Expresión de ARNm de PCSK9 en células Huh-7 24 horas después de la transfección con Lipofectamine y oligonucleótidos LNA compuesto ID n.º: 98 o 101 a 0,04, 0,2, 1,5 o 10 nM. Los datos están normalizados con respecto a Gapdh y se presentan en relación con el control de simulación.

35 Figura 4. Expresión de ARNm de PCSK9 en células Huh-7 24 horas después de la transfección con Lipofectamine y oligonucleótidos de LNA compuesto ID n.º: 9, 16 o 18 a 0,04, 0,2, 1, 5, 10 o 25 nM. Los datos están normalizados con respecto a Gapdh y se presentan en relación con el control de simulación.

40 Figura 5. Resultados *in vitro* en la línea celular de hepatocarcinoma murino Hepa 1-6: Expresión de ARNm de PCSK9 en células Huh-7 24 horas después de la transfección con Lipofectamine y oligonucleótidos de LNA compuesto ID n.º: 262 y 338 a 0,04, 0,2, 1,5, 10 o 25 nM. Los datos están normalizados con respecto a Gapdh y se presentan en relación con el control de simulación.

45 Figura 6. Expresión de ARNm de PCSK9 en células Huh-7 24 horas después de la transfección con Lipofectamine y oligonucleótidos LNA compuesto ID n.º: 98 y 101 a 0,04, 0,2, 1, 5, 10 o 25 nM. Los datos están normalizados con respecto a Gapdh y se presentan en relación con el control de simulación.

50 Figura 7. Examen *in vivo* de oligonucleótidos LNA en ratones C57BL/6 hembra: expresión de ARNm de PCSK9 en hígado después de dosificar 5, 10 o 15 mg/kg compuesto ID n.º: 98, 101 o 317 días 0, 3, 7, 10 y 14. El día 16 los ratones se sacrificaron y se examinó el hígado mediante qPCR con respecto a expresión de ARNm de PCSK9. Los datos representan la media DT y se presentan en relación con el grupo de solución salina.

Figura 8. Colesterol total en suero, VLDL+LDL y HDL medido el día de sacrificio 16 en ratones hembra C57BL/6 dosificadas con 10 mg/kg /dosis de compuesto ID n.º: 98 o 101 los días 0, 3, 7, 10 y 14 mediante inyecciones en la vena de la cola.

55 Figura 9. Se tomaron muestras de hígado el día de sacrificio 16 y se analizaron con respecto al nivel de proteína de receptor de LDL mediante transferencia de Western como se describe en el Ejemplo 13.

60 Figura 10. Ratones hembra NMRI: expresión de ARNm de PCSK9 en hígado después de dosificar 10 mg/kg de compuestos ID N.º: 98 o 101 los días 0, 3, 7, 10 y 14. El día 16 los ratones se sacrificaron y se examinó el hígado mediante qPCR con respecto a expresión de ARNm de PCSK9. Los datos representan la media DT y se presentan en relación con el grupo de solución salina.

Figura 11. Colesterol total en suero de muestra de sangre en el momento del sacrificio (día 16).

65 Figura 12. Se tomaron muestras de hígado el día de sacrificio 16 y se analizaron con respecto a nivel de proteína de receptor de LDL mediante transferencia de Western como se ha descrito en el Ejemplo 13.

Figura 13. Estudio de eficacia en ratones C57BL/6 macho y hembra, alimentados con una dieta alta en grasas (HFD): expresión de ARNm de PCSK9 en hígado después de dosificar 10 o 15 mg/kg de compuestos ID n.º: 98, 101 o 317 los días 0, 3, 7, 10 y 14. El día 16 los ratones se sacrificaron y se examinó el hígado mediante qPCR con respecto a expresión de ARNm de PCSK9. Se alimentó a ratones hembras con una dieta alta en grasa (HFD) durante 5 meses antes de tratamiento con oligonucleótidos LNA y se alimentó a ratones machos con HFD durante un mes antes del tratamiento. Los datos representan la media DT y se presentan en relación con el grupo de solución salina.

Figura 14. Se tomaron muestras de hígado el día de sacrificio 16 y se analizaron con respecto al nivel de proteína de receptor de LDL mediante transferencia de Western como se describe en el Ejemplo 13.

Figura 15. Oligonucleótidos LNA de 13 unidades ensayados en ratones hembra C57BL/6: expresión de ARNm de PCSK9 en hígado después de dosificar 15 mg/kg de compuestos ID n.º: 9, 16, 18 o 98 los días 0, 2 y 4 y el día 6 los ratones se sacrificaron y se examinó el hígado mediante qPCR con respecto a expresión de ARNm de PCSK9. Los datos están normalizados con respecto a Gapdh y se presentan en relación con el grupo de solución salina de media DT.

Figura 16. La distribución de las diferentes fracciones de lipoproteína HDL, VLDL y LDL en suero.

Las lipoproteínas se separaron en geles Sebia y se cuantificaron usando tinción con Sudan Black y

Análisis densitométrico (Molecular Imager FX). Los datos se presentan como media DT, n= 5.

La Figura 17 muestra un alineamiento de secuencias locales de Clustal W entre los ácidos nucleicos codificantes de PCSK9 humano (NM_174936) y de ratón (NM_153565) e ilustra regiones en las que hay suficiente homología de secuencias para diseñar compuestos oligoméricos que son complementarios de los ácidos nucleicos diana de PCSK9 tanto humanos como de ratón (ilustrados por líneas verticales entre los nucleótidos alineados), las áreas sombreadas indican regiones preferidas para dirigir oligonucleótidos (preferentemente en una serie contigua de al menos 12 restos conservados) a actividad PCSK9 tanto humana como de ratón, siendo las regiones subrayadas regiones que se prefieren particularmente.

Casos relacionados

Este caso reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos 60/828.735 y US 60/972.932.

Además, este caso reivindica la prioridad del documento US 60/977.409.

Descripción de la invención

Oligómeros que se dirigen a PCSK9

La presente invención emplea oligonucleótidos antisentido, para su uso en la modulación de la función de moléculas de ácido nucleico que codifican PCSK9 humana, SEQ ID NO 1. El compuesto es complementario de una región correspondiente de SEQ ID NO 2. La PCSK9 de mamífero es PCSK9 humana.

El oligómero típicamente comprende o consiste en una secuencia de nucleobases contiguas.

En una realización, la secuencia de nucleobases del oligonucleótido consiste en la secuencia de nucleobases contiguas.

Subsecuencias y secuencias flanqueantes

En una realización, el compuesto oligomérico comprende al menos una subsecuencia central de al menos 8, tal como al menos 10, tal como al menos 12, tal como al menos 13, tal como al menos 14 nucleobases contiguas, en la que dicha subsecuencia corresponde a una secuencia contigua presente en SEQ ID NO 2.

Las subsecuencias adecuadas pueden seleccionarse de una secuencia que corresponde a una secuencia contigua presente en una de las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO 14, SEQ ID NO 15, SEQ ID No 16, SEQ ID NO 17, SEQ ID NO 18 y SEQ ID NO 19, o una secuencia seleccionada del grupo de secuencias (antisentido) mostradas en las Tablas 2 y 3 y (el complemento de) las secuencias de las secuencias destacadas (sombreadas) (de complementariedad entre ARNm de PCSK9 humano y de ratón) mostradas en la Figura 17.

Las subsecuencias preferidas comprenden o consisten en al menos 8, tal como al menos 10, tal como al menos 12, tal como al menos 13, tal como al menos 14 nucleobases contiguas que corresponden a una secuencia de nucleótidos equivalente presente en una cualquiera de SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6,

SEQ ID NO 7 o SEQ ID NO 8, más preferentemente SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4.

5 El compuesto puede comprender además una secuencia de nucleobases flanqueante 5', o una secuencia flanqueante 3', o una secuencia flanqueante tanto 5' como 3' que son contiguas a dicha subsecuencia, en la que dichas secuencia o secuencias flanqueantes consisten en un total de entre 2 y 22 unidades de nucleobases, que cuando se combinan con dicha subsecuencia, la secuencia de nucleobases contiguas combinadas, es decir que consiste en dicha subsecuencia y dichas secuencia o secuencias flanqueantes, es complementaria de una región correspondiente de SEQ ID NO 2.

10 La secuencia o las secuencias flanqueantes pueden consistir en un total de entre 2 y 22 unidades de nucleobases, tales como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleobases, o tal como entre 4 y 12 nucleobases o tal como entre 2 y 10 nucleobases, tal como entre 5 y 10 nucleobases, o entre 5 y 8 nucleobases, tal como entre 7 y 9 nucleobases.

15 En una realización dicha secuencia flanqueante comprende de al menos 2 unidades de nucleobases que están 5' de dicha subsecuencia.

20 En una realización dicha secuencia flanqueante comprende entre 1 y 6 unidades de nucleobases que están 5' de dicha subsecuencia.

En una realización dicha secuencia flanqueante comprende al menos 2 unidades de nucleobases que están 3' de dicha subsecuencia.

25 En una realización dicha secuencia flanqueante comprende entre 1 y 6 unidades de nucleobases que están 3' de dicha subsecuencia.

Se prefiere que las secuencias de cada una de las secuencias flanqueantes formen cada una una secuencia contigua.

30 *La secuencia de nucleobases contiguas combinada*

La secuencia de nucleobases contiguas combinada, es decir que consiste en dicha subsecuencia y, si está presente, dicha secuencia o dichas secuencias flanqueantes, es complementaria de una secuencia correspondiente presente en SEQ ID NO 2.

35 En una realización, la secuencia flanqueante 3' y/o secuencia flanqueante 5' pueden, de forma independiente, comprender o consistir en entre 1 y 10 nucleobases, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 nucleobases, tal como entre 2 y 6 nucleobases, tal como 3 o 4 nucleobases, que pueden ser, en una realización, análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, o en otra realización una combinación de nucleótidos y análogos de nucleótidos.

40 *Regiones y conjugados de nucleobases*

45 Se reconocerá que el compuesto de la invención que consiste en una secuencia contigua de nucleobases (es decir una secuencia de nucleobases), puede comprender componentes no nucleobases adicionales, tales como los conjugados a los que se hace referencia en el presente documento.

50 Por lo tanto, en una realización, el compuesto de la invención puede comprender tanto una región polinucleotídica, es decir una región de nucleobases, como una región no de nucleobases adicional. Cuando se hace referencia al compuesto de la invención que consiste en una secuencia de nucleobases, el compuesto puede comprender componentes no de nucleobases, tales como un componente conjugado.

Como alternativa, el compuesto de la invención puede consistir completamente en una región de nucleobases (contiguas).

55 En una realización la parte y/o subsecuencia de nucleobases se selecciona de al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14 y al menos 15 nucleótidos o análogos de nucleótidos consecutivos, que son preferentemente complementarios del ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana.

60 En una realización, el compuesto de acuerdo con la invención no consiste en más de 22 nucleobases, tal como no más de 20 nucleobases, tal como no más de 18 nucleobases, tal como 15, 16 o 17 nucleobases, opcionalmente conjugadas con una o más entidades no nucleobases.

Antagonistas de ARN

65 El ácido nucleico que codifica una PCSK9 de mamífero (diana) puede estar en la orientación con sentido o antisentido, preferentemente en la orientación con sentido, tal como la ARNm de PCSK9 (de equivalente de ADNc).

En una realización preferida, el compuesto puede dirigirse a un ácido nucleico diana que es un transcrito o transcritos de ARN del gen o los genes que codifican las proteínas diana, tales como ARNm o pre ARNm.

El compuesto de la invención es un oligonucleótido antisentido.

5
Convenientemente, cuando el oligonucleótido antisentido se introduce en la célula que expresa el gen de PCSK9, da como resultado la reducción del nivel de ARNm de PCSK9, dando como resultado la reducción del nivel de expresión de la PCSK9 en la célula.

10 Los oligómeros que se dirigen al ARNm de PCSK9 pueden hibridar con cualquier sitio a lo largo del ácido nucleico de ARNm diana, tal como el líder 5' no traducido, exones, intrones y cola 3' no traducida. Sin embargo, se prefiere que los oligómeros que se dirigen al ARNm de PCSK9 hibriden con la forma de ARNm madura del ácido nucleico diana.

15 Cuando se diseñan como un inhibidor antisentido, por ejemplo, los oligonucleótidos de la invención se unen con el ácido nucleico diana y modulan la expresión de su proteína afín. Preferentemente, dicha modulación produce una inhibición de la expresión de al menos 10 % o 20 % en comparación con el nivel de expresión normal, más preferentemente al menos una inhibición de 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % en comparación con el nivel de expresión normal. Convenientemente, dicha modulación se ve cuando se usan concentraciones entre 5 y
20 25 nM del compuesto de la invención. En la misma realización o una diferente, la inhibición de la expresión es menor del 100 %, tal como menor del 98 % de inhibición, menor del 95 % de inhibición, menor del 90 % de inhibición, menor del 80 % de inhibición, tal como menor del 70 % de inhibición. La modulación del nivel de expresión se determina midiendo los niveles de proteínas, por ejemplo, mediante los métodos tales como SDS-PAGE seguido de
25 transferencia de western usando anticuerpos adecuados inducidos contra la proteína diana. Como alternativa, la modulación de los niveles de expresión puede determinarse midiendo los niveles de ARNm, por ejemplo mediante transferencia de northern o RT-PCR cuantitativa. Cuando se mide mediante los niveles de ARNm, el nivel de regulación negativa cuando se usa una dosificación apropiada, tal como concentraciones entre 5 y 25 nM, es, en una realización, típicamente hasta un nivel de entre 10 y 20 % de los niveles normales en ausencia del compuesto de la invención.

30 El compuesto de acuerdo con la invención es un oligonucleótido antisentido.

El compuesto no es un ARNip.

35 En una realización, el compuesto de la invención no comprende ARN (unidades).

La longitud de un oligómero (o secuencia de nucleobases contiguas) se determinará por la que dé como resultado inhibición de la diana. Para una coincidencia perfecta con la diana, la secuencia de nucleótidos contiguos u oligómero tan pocas como 8 bases pueden ser suficientes, pero generalmente serán más, por ejemplo 10 o 12, y
40 preferentemente entre 12 y 16. El tamaño máximo del oligómero se determinará por factores tales como el coste y la conveniencia de producción, la capacidad de manipular el oligómero e introducirlo en una célula que porte el ARNm diana, y también la afinidad de unión deseada y la especificidad diana. Si es demasiado largo, puede tolerar de forma indeseable un número mayor de desapareamientos, lo que puede conducir a unión inespecífica.

45 El compuesto (oligómero o compuesto oligomérico) de la invención consiste en o comprende entre 10 y 25 nucleobases, tales como 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23 o 24 nucleobases.

Son compuestos particularmente preferidos oligonucleótidos antisentido que comprenden de aproximadamente 12 a 25 nucleobases y en una realización son compuestos antisentido que comprenden 13-18 nucleobases tales como
50 13, 14, 15, 16 o 17 nucleobases. En una realización, el oligómero de acuerdo con la invención consiste en no más de 22 nucleobases. En una realización se prefiere que el compuesto de la invención comprenda menos de 20 nucleobases.

55 En una realización, el oligómero de acuerdo con la invención consiste en no más de 22 nucleobases, tal como no más de 20 nucleobases, tal como no más de 18 nucleobases, tal como 15, 16 o 17 nucleobases, opcionalmente conjugadas con una o más entidades no de nucleobases, tal como un conjugado.

60 En una realización, el oligómero o secuencia de nucleobases contiguas tiene una longitud de entre 10 y 22 nucleobases.

65 En una realización, el oligómero o secuencia de nucleobases contiguas tiene una longitud de entre 10 y 18 nucleobases.

En una realización, el oligómero o secuencia de nucleobases contiguas tiene una longitud de entre 10 y 16 nucleobases.

En una realización, el oligómero o secuencia de nucleobases contiguas tiene una longitud de entre 12 y 16 nucleobases.

5 En una realización, el oligómero o secuencia de nucleobases contiguas tiene una longitud de entre 12 y 14 nucleobases.

En una realización, el oligómero o secuencia de nucleobases contiguas tiene una longitud de entre 14 y 16 nucleobases.

10 En una realización, el oligómero o secuencia de nucleobases contiguas tiene una longitud de entre 14 y 18 nucleobases.

En una realización, el oligómero o secuencia de nucleobases contiguas tiene una longitud de 14, 15 o 16 nucleobases.

15 En una realización, el oligómero o secuencia de nucleobases contiguas tiene una longitud de entre 10 y 14 nucleobases, tales como 10, 11, 12, 13 o 13 nucleobases. Como se desvela en el documento US 60/977.409, dichos oligonucleótidos cortos, es decir "shortmer" son sorprendentemente eficaces en la regulación negativa diana *in vivo*.

20 *Secuencias preferidas*

Las secuencias diana de la invención pueden, en una realización no limitante, identificarse de la siguiente manera. En una primera etapa se identifican regiones conservadas en el gen diana. Entre esas regiones conservadas, se excluye normalmente cualquier secuencia con polimorfismos (a no ser que se requiera para un fin específico) ya que estas pueden afectar a la especificidad de unión y/o afinidad de un oligómero diseñado para unirse con una secuencia diana en esta región. Normalmente se excluye cualquier región con secuencias palindrómicas o repetidas. Las regiones restantes se analizan después y se identifican secuencias diana candidatas de longitud adecuada (tales como las longitudes de la secuencia de nucleobases contiguas/oligómero indicadas en el presente documento), por ejemplo, 10-25 nucleobases, más preferentemente 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleobases. Las secuencias diana que, basándose en análisis informático, probablemente formen estructuras tales como dímeros o estructuras en horquilla normalmente se excluyen.

Preferentemente estas secuencias diana candidatas muestran un alto grado de homología de secuencia en todo el reino animal, o al menos entre animales que probablemente se requieran para ensayos preclínicos. Esto permite el uso de las secuencias oligoméricas identificadas, y los oligómeros correspondientes tales como oligonucleótidos antisentido, para ensayar en modelos animales. Son particularmente útiles secuencias diana que están conservadas en ser humano, chimpancé, perro, rata, ratón y más preferentemente en ser humano y ratón (y/o rata).

Se proporcionar en la Tabla 3, en el presente documento, secuencias de nucleobases adecuadas, tales como secuencias de motivos de los oligómeros de la invención.

En una realización la secuencia de nucleobases contiguas es una secuencia de nucleótidos contiguos presente en una secuencia de ácido nucleico mostrada en la Tabla 3, tal como una secuencia de nucleótidos contiguos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 40 a SEQ ID NO 393; SEQ ID 30 a SEQ ID 39; SEQ ID NO 3, 4 y 5.

Otros oligonucleótidos preferidos incluyen secuencias de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 nucleobases continuas (tales como contiguas) seleccionadas de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NO 40 a SEQ ID NO 393; SEQ ID 30 a SEQ ID 39; SEQ ID NO 3, 4 y 5.

50 Algunos oligómeros preferidos, y secuencias de nucleobases de la invención se muestran en la Tabla 2.

En una realización la parte de nucleobases (tal como la secuencia de nucleobases contiguas) se selecciona de, o comprende, una de las siguientes secuencias: SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18 y SEQ ID No 19 o, en una realización una subsecuencia de la misma, tal como una subsecuencia de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 nucleobases continuas (tales como contiguas).

En una realización la secuencia de nucleobases contiguas es una secuencia de nucleótidos contiguos presente en una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 34, SEQ ID NO 35, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 38 y SEQ ID NO 39, o, en una realización una subsecuencia de la misma, tal como una subsecuencia de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 nucleobases continuas (tales como contiguas).

65 En una realización la nucleobase contigua u oligómero se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID NO 10, SEQ ID NO 20, SEQ ID NO 11, SEQ ID NO 9, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO 22, SEQ ID NO 23, SEQ ID NO 24, SEQ

5 ID NO 25, SEQ ID NO 26, SEQ ID NO 27, SEQ ID NO 28 y SEQ ID NO 29 o, en una realización una subsecuencia de la misma, tal como una subsecuencia de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 nucleobases continuas (tales como contiguas). En una realización la parte de nucleobase se selecciona de, o comprende, una de las siguientes secuencias: SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8, (preferentemente SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4) o, en una realización una subsecuencia de la misma, tal como una subsecuencia de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 nucleobases continuas (tales como contiguas).

10 Otros oligonucleótidos preferidos incluyen secuencias de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 nucleobases continuas (tales como contiguas) seleccionadas de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NO 9, 10 y 11. Un aspecto preferido adicional de la invención se dirige a compuestos que consisten en o comprenden SEQ ID NO 9, 10 u 11.

15 Se entenderá por el experto en la materia que en una realización cuando se hace referencia a secuencias oligonucleotídicas de gapmer específicas, tales como las proporcionadas en el presente documento (por ejemplo SEQ ID NOS 9, 10 y 11) cuando los enlaces son enlaces fosforotioato, pueden usarse enlaces alternativos, tales como los desvelados en el presente documento, por ejemplo enlaces de fosfato, particularmente para enlaces entre unidades de análogos de nucleótidos, tales como LNA. De forma similar, cuando se hace referencia a secuencias oligonucleotídicas de gapmer específicas, tales como las proporcionadas en el presente documento (por ejemplo SEQ ID NOS 9, 10 y 11), cuando los restos C se anotan como citosina 5' metil modificada, en una realización, una o más de las C presentes en el oligonucleótido pueden ser restos de C no modificados.

20 En una realización la secuencia de nucleobases consiste en o comprende una secuencia que es, o corresponde a, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8, o una secuencia contigua de al menos 12, 13, 14, 15 o 16 nucleobases consecutivas presentes en dicha secuencia, en la que los nucleótidos presentes en el compuesto pueden sustituirse con un análogo de nucleótido correspondiente y en el que dicho compuesto puede comprender uno, dos o tres desapareamientos contra dicha secuencia seleccionada.

25 En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 3 o una secuencia de nucleobases equivalente.

30 En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 4 o una secuencia de nucleobases equivalente.

35 En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 5 o una secuencia de nucleobases equivalente.

40 En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 6 o una secuencia de nucleobases equivalente.

45 En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 7 o una secuencia de nucleobases equivalente.

50 En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 8 o una secuencia de nucleobases equivalente.

55 En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 9.

60 En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 10.

65 En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 11.

En una realización el compuesto de acuerdo con la invención consiste en o comprende SEQ ID NO 30, SEQ ID NO 31, SEQ ID NO 32, SEQ ID NO 33, SEQ ID NO 34, SEQ ID NO 35, SEQ ID NO 36, SEQ ID NO 37, SEQ ID NO 38, o SEQ ID NO 39.

Otros oligómeros de la invención incluyen secuencias de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 nucleobases continuas (tales como contiguas) seleccionadas de una de las SEQ ID enumeradas anteriormente o los compuestos ID n.º como se indica en los ejemplos.

Otros oligómeros de la invención incluyen secuencias de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 nucleobases continuas (tales como contiguas) seleccionadas de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18 y SEQ ID No 19, o una secuencia seleccionada del grupo de secuencias (antisentido) mostradas en la Tabla 2 o en la Tabla 3.

Otros oligómeros de la invención incluyen secuencias de 10, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 nucleobases continuas (tales como contiguas) seleccionadas de una secuencia del grupo que consiste en SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID

NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7, SEQ ID NO 8, SEQ ID NO 47, SEQ ID NO 49, SEQ ID NO 54, SEQ ID NO 56, SEQ ID NO 118, SEQ ID NO 136 y SEQ ID NO 139.

5 Los compuestos preferidos consisten en 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleobases continuas (tales como contiguas) que corresponden a una secuencia de nucleótidos presente en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8, o preferentemente SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 4.

10 Se muestran compuestos preferidos adicionales en las Tablas 2 y 3 del documento US 60/828.735 y la Tabla 4 del documento US 60/972.932, que se incorporan específicamente por la presente en la presente memoria descriptiva (como se indica en la lista específica de realizaciones enumerada en el presente documento).

15 Convenientemente, el oligómero de acuerdo con la invención consiste en o comprende una de las secuencias SEQ ID anteriormente mencionadas.

Complementariedad y desapareamientos

20 El compuesto de la invención consiste en una secuencia de nucleobases (contiguas) que es complementaria de una región correspondiente (contigua) de la SEQ ID NO 2.

En referencia a los principios por los que el compuesto puede inducir su acción terapéutica, la diana de la presente invención puede ser el ARNm derivado de la secuencia correspondiente presente en el ácido nucleico que codifica el polipéptido de PCSK9, tal como SEQ ID NO 2 o variantes alélicas de origen natural del mismo.

25 Se reconocerá que cuando se hace referencia a un motivo de secuencias de nucleótidos preferido o secuencia de nucleótidos, que consiste solamente en nucleótidos, los compuestos de la invención que se definen por esa secuencia pueden comprender un análogo de nucleótido correspondiente en lugar de uno o más de los nucleótidos presentes en dicha secuencia, tales como unidades de LNA u otros análogos de nucleótidos que elevan la T_m de la doble cadena de oligonucleótido/diana, tal como los análogos de nucleótidos descritos posteriormente, particularmente LNA y/o nucleótidos 2' sustituidos (2' modificados).

Análogos de nucleótidos

35 En una realización, al menos una de las nucleobases presentes en el oligómero es una nucleobase modificada seleccionada del grupo que consiste en 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

40 Se reconocerá que cuando se hace referencia a un motivo de secuencia de nucleótidos o secuencia de nucleótidos preferido, que consiste solamente en nucleótidos, los oligómeros de la invención que se definen por esa secuencia pueden comprender un análogo de nucleótido correspondiente en lugar de uno o más de los nucleótidos presentes en dicha secuencia, tales como unidades de LNA u otros análogos de nucleótidos, que aumentan la estabilidad de doble cadena/ T_m de la doble cadena de oligómero/diana (es decir análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad).

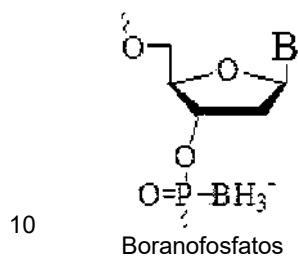
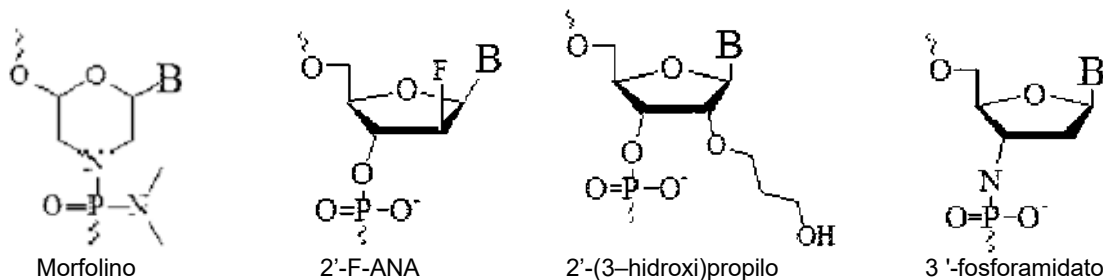
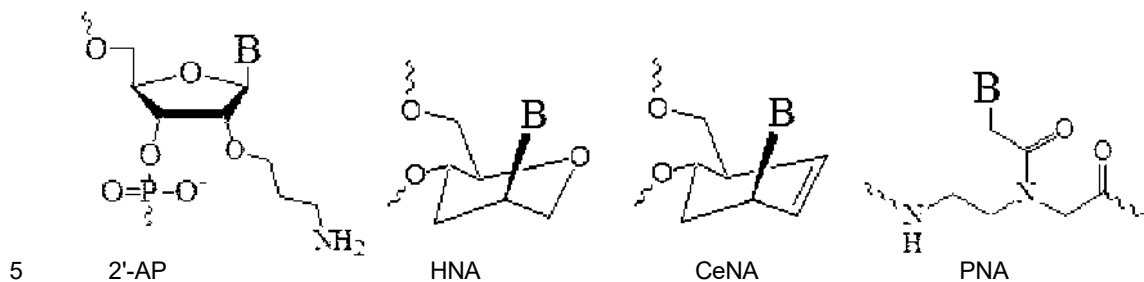
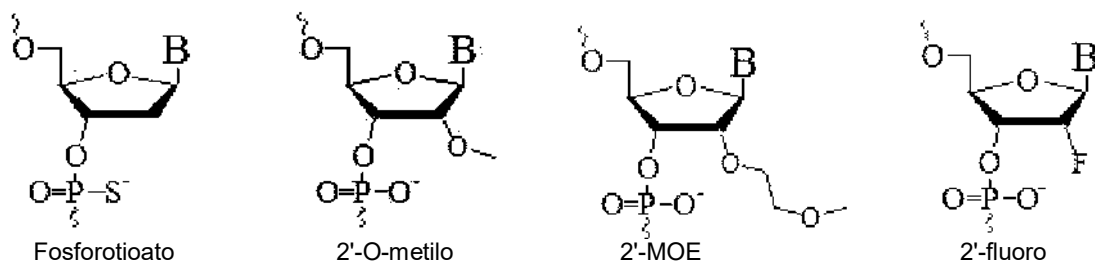
45 Además, los análogos de nucleótidos pueden potenciar la estabilidad del oligómero *in vivo*.

50 La incorporación de análogos de nucleótidos potenciadores de la afinidad en la secuencia de nucleobases del oligómero, tales como LNA o azúcares 2'-sustituidos, preferentemente LNA, puede permitir que se reduzca el tamaño del oligonucleótido de unión específica, y también puede reducir el límite superior del tamaño del oligonucleótido antes de que tenga lugar unión no específica o aberrante. Un análogo de nucleótidos potenciador de la afinidad es uno que, cuando se inserta en la secuencia de nucleobases del oligómero da como resultado una T_m aumentada del oligómero cuando se forma en una doble cadena con un ARN complementario (tal como la diana de ARNm), en comparación con un oligómero equivalente que comprende un nucleótido de ADN en lugar del análogo de nucleótido potenciador de la afinidad. Se proporcionan ejemplos de análogos de nucleótidos adecuados y preferidos por el documento WO2007/031091 o se hace referencia a ellos en el mismo.

55 En algunas realizaciones al menos uno de dichos análogos de nucleótidos es 2'-MOE-ARN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de nucleobases de 2'-MOE-ARN.

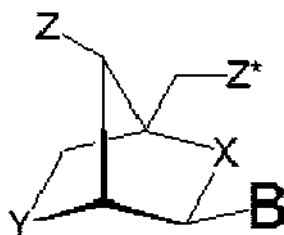
60 En algunas realizaciones al menos uno de dichos análogos de nucleótidos es 2'-fluoro-ADN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de nucleobases 2'-fluoro-ADN.

65 Se describen ejemplos específicos de análogos de nucleósidos que pueden utilizarse en los oligómeros de la presente invención por ejemplo en Freier y Altmann; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, y en el Esquema 1 y 2.



Esquema 1

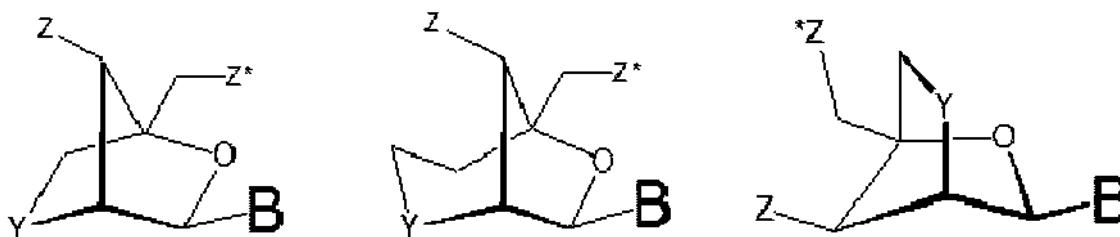
15 El término "LNA" se refiere a un análogo de nucleótido bicíclico, conocido como "ácido nucleico bloqueado". Puede referirse a un monómero de LNA o, cuando se usa en el contexto de un "oligonucleótido ULNA" se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más de dichos análogos de nucleótidos bicíclicos. El LNA usado en los compuestos oligonucleotídicos de la invención preferentemente tiene la estructura de la fórmula general



20 en la que X e Y se seleccionan independientemente entre los grupos -O-, -S-, -N(H)-, N(R)-, -CH₂- o -CH- (si es parte de un doble enlace), -CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-N(H)-, -CH₂-N(R)-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-CH- (si es parte de un doble enlace), -CH=CH-, en la que R se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄; Z y Z* se seleccionan independientemente de entre un enlace internucleosídico, un grupo terminal o un grupo protector; B constituye un resto de base nucleotídica natural o no natural; y los grupos asimétricos pueden encontrarse en cualquiera de las orientaciones.

25

Preferentemente, el LNA usado en el oligómero de la invención comprende al menos una unidad de LNA de acuerdo con cualquiera de las fórmulas

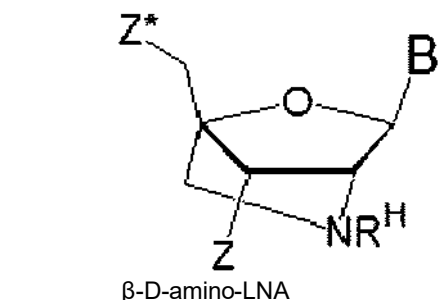
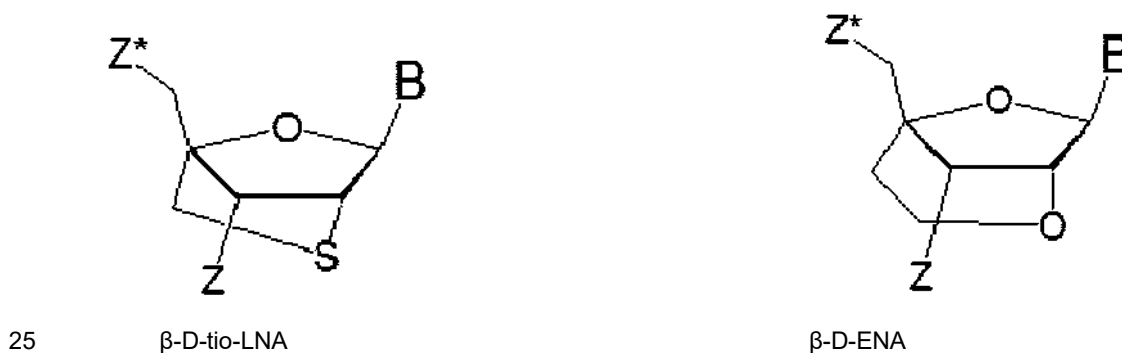


5 en las que Y es -O-, -S-, -NH-, o $N(R^H)$; Z y Z^* se seleccionan independientemente de entre un enlace internucleosídico, un grupo terminal o un grupo protector; B constituye un resto de base nucleotídica natural o no natural; y R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C_{1-4} .

10 Preferentemente, el ácido nucleico bloqueado (LNA) usado en el compuesto oligomérico, tal como un oligonucleótido antisentido, de la invención comprende al menos un nucleótido que comprende una unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA) de acuerdo con cualquiera de las fórmulas mostradas en el Esquema 2 del documento WO2007/031091.

15 Preferentemente, el LNA usado en el oligómero de la invención comprende enlaces internucleosídicos seleccionados de -O-P(O)₂-O-, -O-P(O,S)-O-, -O-P(S)₂-O-, -S-P(O)₂-O-, -S-P(O,S)-O-, -S-P(S)₂-O-, -O-P(O)₂-S-, -O-P(O,S)-S-, -S-P(O)₂-S-, -O-PO(R^H)-O-, O-PO(OCH₃)-O-, -O-PO(NR^H)-O-, -O-PO(OCH₂CH₂S-R)-O-, -O-PO(BH₃)-O-, -O-PO(NHR^H)-O-, -O-P(O)₂-NR^H-, -NR^H-P(O)₂-O-, -NR^H-CO-O-, donde R^H se selecciona de hidrógeno y alquilo C_{1-4} .

Se muestran unidades de LNA específicamente preferidas en el Esquema 2:



Esquema 2

La expresión "tio-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que al menos una de X o Y en la fórmula general anterior se selecciona de S o -CH₂-S-. Tio-LNA puede estar en configuración tanto beta-D como alfa-L.

5 La expresión "amino-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que al menos uno de X o Y en la fórmula general anterior se selecciona de -N(H)-, N(R)-, CH₂-N(H)-, y -CH₂-N(R)- donde R se selecciona de hidrógeno y alquilo C₁₋₄. Amino-LNA puede estar en configuración tanto beta-D como alfa-L.

10 La expresión "oxi-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que al menos uno de X o Y en la fórmula general anterior representa -O- o -CH₂-O-. Oxi-LNA puede estar en configuración tanto beta-D como alfa-L.

La expresión "ena-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior es -CH₂-O- (donde el átomo de oxígeno de -CH₂-O- se une a la posición 2' relativa a la base B).

15 En una realización preferida LNA se selecciona de beta-D-oxi-LNA, alfa-L-oxi-LNA, beta-D-amino-LNA y beta-D-tio-LNA, en particular beta-D-oxi-LNA.

Preferentemente, dentro del compuesto de acuerdo con la invención, tal como un oligonucleótido antisentido, que comprende LNA, todos los restos C de LNA son 5' metil-citosina.

20 Preferentemente las unidades de LNA del compuesto, tales como un oligonucleótido antisentido, de la invención se seleccionan de uno o más de los siguientes: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA, ena-LNA y/o alfa-LNA en las configuraciones D-beta o L-alfa o combinaciones de las mismas. Beta-D-oxi-LNA es un LNA preferido para su uso en los compuestos oligoméricos de la invención. Tio-LNA también puede preferirse para su uso en los compuestos oligoméricos de la invención. Amino-LNA también puede preferirse para su uso en los compuestos oligoméricos de la invención. Oxi-LNA también puede preferirse para su uso en los compuestos oligoméricos de la invención. Ena-LNA también puede preferirse para su uso en los compuestos oligoméricos de la invención. Alfa-LNA también puede preferirse para su uso en los compuestos oligoméricos de la invención.

30 El ácido nucleico bloqueado (LNA) usado en el compuesto, tal como un oligonucleótido antisentido, de la invención tiene la estructura de la fórmula general mostrada en el Esquema 1 del documento WO2007/031091. Las expresiones "tio-LNA", "amino-LNA", "oxi-LNA", "ena-LNA", "alfa-L-LNA", "derivados de LNA", "nucleótido bloqueado" y "nucleobase bloqueada" también se usan como se define en el documento WO2007/031091.

35 Convenientemente, cuando la secuencia de nucleobases del oligómero, o la secuencia de nucleobases contiguas, no es completamente complementaria de la región correspondiente de la secuencia diana de PCSK9, en una realización, cuando el oligómero comprende análogos de nucleótidos potenciadores de afinidad, dichos análogos de nucleótidos forman un complemento con su nucleótido correspondiente en la diana de PCSK9.

40 El oligómero puede por tanto comprender o consistir en una secuencia sencilla de los nucleótidos naturales, preferentemente 2'-desoxinucleótidos (denominados en general en el presente documento "ADN"), pero también posiblemente ribonucleótidos (denominados en el presente documento en general "ARN"), o podría comprender uno o más (y posiblemente consistir completamente en) "análogos" de nucleótidos.

45 Los "análogos" de nucleótidos son variantes de nucleótidos de ADN o ARN naturales en virtud de modificaciones en el azúcar y/o base y/o partes de fosfato. El término "nucleobase" se usará para abarcar nucleótidos naturales (tipo ADN o ARN) así como "análogos" de los mismos. Los análogos podrían en principio ser únicamente "silenciosos" o "equivalentes" a los nucleótidos naturales en el contexto del oligonucleótido, es decir no tener efecto funcional en la manera en que el oligonucleótido actúa con respecto a la expresión de PCSK9. Dichos análogos "equivalentes" pueden no obstante ser útiles si, por ejemplo, son más fáciles o más baratos de fabricar, o son más estables frente a condiciones de almacenamiento o fabricación, o presentan un marcador o una etiqueta. Preferentemente, sin embargo, los análogos tendrán un efecto funcional en la manera en que el oligonucleótido actúa para inhibir la expresión; por ejemplo produciendo afinidad de unión aumentada por la diana y/o resistencia aumentada para nucleasas intracelulares y/o facilidad aumentada de transporte a la célula.

50 Los ejemplos de dicha modificación del nucleótido incluyen modificación del resto de azúcar para proporcionar un grupo 2'-sustituyente o para producir una estructura enlazada (ácido nucleico bloqueado) que potencia la afinidad de unión y probablemente también proporcione alguna resistencia a nucleasa aumentada; modificación del enlace internucleotídico de su fosfodiéster normal a uno que es más resistente a ataque de nucleasa, tal como fosforotioato o boranofosfato, siendo estos dos escindibles por RNasa H, también permiten esa vía de inhibición antisentido en la modulación de la expresión de PCSK9.

60 En algunas realizaciones, el oligómero comprende de 3 a 8 análogos de nucleótidos, por ejemplo 6 o 7 análogos de nucleótidos. En las realizaciones con mucho más preferidas, al menos uno de dichos análogos de nucleótidos es un ácido nucleico bloqueado (LNA); por ejemplo al menos 3 o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, u 8, de los análogos de nucleótidos pueden ser LNA. En algunas realizaciones todos los análogos de nucleótidos pueden ser LNA.

65

En algunas realizaciones los análogos de nucleótidos presentes dentro del oligómero de la invención en las regiones A y C mencionadas en el presente documento se seleccionan independientemente de, por ejemplo: unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de LNA, unidades de ácido arábico nucleico (ANA), unidades de 2'-fluoro-ANA, unidades de HNA, unidades de INA (ácido nucleico intercalante) y unidades de 2'MOE. También se considera que los análogos de nucleótidos presentes en un oligómero de la invención son todos iguales, aunque permitiendo una variación de bases.

Son análogos de nucleótidos preferidos 2'-O-metoxietil-ARN (2'MOE), monómeros de 2'-fluoro-ADN y LNA y como tal el oligonucleótido de la invención puede comprender análogos de nucleótidos que se seleccionan independientemente de estos tres tipos de análogos, o puede comprender solamente un tipo de análogo seleccionado de los tres tipos.

Los compuestos de acuerdo con la invención son, en una realización, los que consisten en o comprenden una secuencia seleccionada de SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8, o preferentemente SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 4, en los que, en una realización los nucleótidos presentes en el compuesto pueden sustituirse con un análogo de nucleótido correspondiente,

Son compuestos preferidos de acuerdo con la invención los que consisten en o comprenden SEQ ID NO 3 o 4, en los que contienen al menos un análogo de ácido nucleico, en el que en una realización, las unidades de LNA pueden sustituirse con un análogo de nucleótido correspondiente alternativo.

Se prefieren análogos de nucleótidos que aumenten la T_m del oligonucleótido/ácido nucleico diana, en comparación con el nucleótido equivalente.

Preferentemente, el compuesto de acuerdo con la invención comprende al menos un análogo de nucleótido, tal como unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA), tal como 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 análogos de nucleótidos, tales como unidades de ácido nucleico bloqueado (LNA), preferentemente entre 4 y 9 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, tales como 6-9 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, más preferentemente 6, 7 u 8 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA.

El término LNA se usa como se define en la solicitud de PCT WO2007/031091.

Preferentemente las unidades de LNA comprenden al menos una unidad o unidades beta-D-oxi-LNA tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de beta-D-oxi-LNA. El compuesto de la invención, tal como el oligonucleótido antisentido, puede comprender más de un tipo de unidad de LNA. Convenientemente, el compuesto puede comprender tanto beta-D-oxi-LNA como una o más de las siguientes unidades de LNA: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA, ena-LNA y/o alfa-LNA en las configuraciones D-beta o L-alfa o combinaciones de las mismas.

Preferentemente, el compuesto, tal como un oligonucleótido antisentido, puede comprender ambos análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA y unidades de ADN. Preferentemente el total combinado de nucleobases, tales como, unidades de LNA y ADN, es entre 10 y 20, tal como 14-20, tal como entre 15 y 18, tal como 15, 16 o 17 unidades de nucleobases, o es un shortmer como se indica en el presente documento. Preferentemente la relación de análogos de nucleótidos con respecto a ADN presente en el compuesto oligomérico de la invención es de entre 0,3 y 1, más preferentemente entre 0,4 y 0,9, tal como entre 0,5 y 0,8.

Preferentemente, el compuesto de la invención, tal como un oligonucleótido antisentido, consiste en un total de 10 - 25, o 12-25 nucleótidos y/o análogos de nucleótidos, en los que dicho compuesto comprende una subsecuencia de al menos 8 nucleótidos o análogos de nucleótidos, localizándose dicha subsecuencia dentro de (es decir correspondiente a) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No 14, SEQ ID No 15, SEQ ID No 16, SEQ ID No 17, SEQ ID No 18 y SEQ ID No 19.

En un aspecto de la invención, los nucleótidos (y/o análogos de nucleótidos) se unen entre sí por medio de un grupo de fosforotioato. Una realización interesante de la invención se dirige a compuestos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 y SEQ ID NO 8, en el que cada grupo de enlace dentro de cada compuesto es un grupo de fosforotioato. Dichas modificaciones se indican por el subíndice S.

Las tablas indicadas en el presente documento proporcionan secuencias de nucleobases adicionales de compuestos de la invención.

En realizaciones adicionales, el compuesto de la invención, tal como el oligonucleótido antisentido de la invención puede comprender o consistir en 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 nucleobases.

Preferentemente el compuesto de acuerdo con la invención, tal como un oligonucleótido antisentido, comprende o consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, en particular 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, tales como entre 1 y 10

análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA tales como entre 2 y 8 análogos de nucleótidos tales como unidades de LNA.

Reclutamiento de RNasaH

5 Es preferible que dicha subsecuencia o secuencia de nucleobases combinadas comprenda una secuencia continua (contigua) de al menos 7 restos de nucleobases, tales como al menos 8 o al menos 9 restos de nucleobases, incluyendo 7, 8 o 9 nucleobases, que, cuando se forman en una doble cadena con el ARN diana complementario correspondiente a cada uno de dichos polinucleótidos que codifican dicha PCSK9 de mamífero sean capaces de reclutar RNasaH, tales como nucleótidos de ADN.

10 El tamaño de la secuencia contigua que es capaz de reclutar RNasaH puede ser mayor, tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de nucleobases.

15 La secuencia contigua que es capaz de reclutar RNasaH puede ser región B como se indica en el contexto de un gapmer como se describe en el presente documento.

20 El documento EP 1 222 309 proporciona métodos *in vitro* para determinar actividad RNasaH, que puede usarse para determinar la capacidad de reclutar RNasaH. Un compuesto se considera capaz de reclutar RNasaH si, cuando se proporciona con la diana de ARN complementaria, tiene una velocidad inicial, como se mide en pmol//min, de al menos 1 %, tal como al menos 5 %, tal como al menos 10 % o menos del 20 % del oligonucleótido solamente de ADN equivalente, sin sustituciones 2', con grupos de enlace de fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada por el Ejemplo 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

25 Un compuesto se considera esencialmente incapaz de reclutar RNasaH si, cuando se proporciona con la diana de ARN complementaria, y RNasaH, la velocidad inicial de RNasaH, como se mide en pmol//min, es menor del 1 %, tal como menor del 5 %, tal como menor del 10 % o menor del 20 % de la velocidad inicial determinada usando el oligonucleótido de solamente ADN equivalente, sin sustituciones 2', con grupos de enlace de fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, usando la metodología proporcionada por el Ejemplo 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

30 Sin embargo, también se reconoce que los oligonucleótidos antisentido pueden actuar mediante degradación no mediada por RNasaH de ARNm mediada, tal como mediante impedimento estérico de la traducción, u otros métodos.

35 El compuesto de la invención puede comprender una secuencia de nucleobases que comprende tanto nucleótidos como análogos de nucleótidos, y puede estar en forma de un gapmer, un headmer o un mixmer.

40 Un headmer se define por un tramo contiguo de análogos de nucleótidos en el extremo 5' seguido de un tramo contiguo de ADN o unidades de nucleobases modificadas reconocibles y escindibles por la RNasaH hacia el extremo 3' (tal como al menos 7 de dichas nucleobases), y un tailmer se define por un tramo contiguo de ADN o monómeros modificados reconocibles y escindibles por la RNasaH en el extremo 5' (tal como al menos 7 de dichas nucleobases), seguido de un tramo contiguo de análogos de nucleótidos hacia el extremo 3'. Otras quimeras de acuerdo con la invención, denominadas mixmers que consisten en una composición alternativa de ADN o monómeros modificados reconocibles y escindibles por RNasaH y análogos de nucleótidos. Algunos análogos de nucleótidos también pueden ser capaces de mediar en la unión y escisión de RNasaH. Ya que α -L-LNA recluta actividad RNasaH en un cierto grado, podría requerirse huecos más pequeños de ADN o monómeros modificados reconocibles y escindibles por la RNasaH para la construcción de gapmer, y podría introducirse más flexibilidad en la construcción de mixmer.

Gapmers

Preferentemente, el compuesto de la invención es un oligonucleótido antisentido que es un gapmer.

55 Preferentemente el gapmer comprende una secuencia de (poli)nucleobases de fórmula (5' a 3'), A-B-C (y opcionalmente D), en la que A (región 5') consiste en o comprende al menos un análogo de nucleótido, tal como al menos una unidad de LNA, tal como entre 1 y 6 análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA, preferentemente entre 2 y 5 análogos de nucleótidos, tales como 2-5 unidades de LNA, tales como 3 o 4 análogos de nucleótidos, tales como 3 o 4 unidades de LNA y B (dominio central), preferentemente inmediatamente 3' (es decir contiguo) de A, consiste en o comprende al menos una unidad de azúcar de ADN, tal como 1-12 unidades de ADN, preferentemente entre 4 y 12 unidades de ADN, más preferentemente entre 6 y 10 unidades de ADN, tal como entre 7 y 10 unidades de ADN, más preferentemente 8, 9 o 10 unidades de ADN; y C (región 3') preferentemente inmediatamente 3' de B, consiste en o comprende en al menos un análogo de nucleótido, tal como al menos una unidad de LNA, tal como entre 1 y 6 análogos de nucleótidos, tal como entre 2 y 5 análogos de nucleótidos, tal como entre 2 y 5 unidades de LNA, más preferentemente 3 o 4 análogos de nucleótidos, tales como 3 o 4 unidades de LNA. Se desvelan diseños de gapmer preferidos en el documento WO2004/046160.

Los diseños de gapmer preferidos incluyen, cuando:

- A Consiste en 3 o 4 análogos de nucleótidos consecutivos
- 5 B Consiste en 7 a 10 nucleótidos de ADN consecutivos o nucleobases equivalentes que son capaces de reclutar RNAsaH
- C Consiste en 3 o 4 análogos de nucleótidos consecutivos
- 10 D Consiste, cuando está presente, en un nucleótido de ADN.
- O cuando
- 15 A Consiste en 3 análogos de nucleótidos consecutivos
- B Consiste en 9 nucleótidos de ADN consecutivos o nucleobases equivalentes que son capaces de reclutar RNAsaH
- 20 C Consiste en 3 análogos de nucleótidos consecutivos
- D Consiste, cuando está presente, en un nucleótido de ADN.
- O cuando
- 25 A Consiste en 4 análogos de nucleótidos consecutivos
- B Consiste en 8 nucleótidos de ADN consecutivos o nucleobases equivalentes que son capaces de reclutar RNAsaH
- 30 C Consiste en 4 análogos de nucleótidos consecutivos
- D Consiste, cuando está presente, en un nucleótido de ADN.
- O cuando
- 35 A Consiste en 2 análogos de nucleótidos consecutivos
- B Consiste en 8 nucleótidos de ADN consecutivos o nucleobases equivalentes que son capaces de reclutar RNAsaH
- 40 C Consiste en 3 análogos de nucleótidos consecutivos
- D Consiste, cuando está presente, en un nucleótido de ADN.
- 45 O cuando
- A Consiste en 3 análogos de nucleótidos consecutivos
- 50 B Consiste en 8 nucleótidos de ADN consecutivos o nucleobases equivalentes que son capaces de reclutar RNAsaH
- C Consiste en 2 análogos de nucleótidos consecutivos
- 55 D Consiste, cuando está presente, en un nucleótido de ADN.
- O cuando
- A Consiste en 2 análogos de nucleótidos consecutivos
- 60 B Consiste en 8 nucleótidos de ADN consecutivos o nucleobases equivalentes que son capaces de reclutar RNAsaH
- C Consiste en 2 análogos de nucleótidos consecutivos
- 65 D Consiste, cuando está presente, en un nucleótido de ADN.

Los nucleótidos de ADN en el dominio central (B) pueden sustituirse con uno o más, o incluso todos los nucleótidos de ADN pueden sustituirse con una nucleobase, incluyendo análogos de nucleótidos que son capaces de reclutar RNAsa H.

5 En las realizaciones anteriores en referencia a diseños de gapmer, la región de hueco 'B' puede ser como alternativa de 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de ADN consecutivos o nucleobases equivalentes que son capaces de reclutar RNAsaH.

10 En un oligonucleótido gapmer, es altamente preferible que cualquier desapareamiento no esté dentro del dominio central (B) anterior, esté al menos dentro de un tramo mínimo de 7 nucleobases continuas del dominio central, tales como 7, 8 o 9 o 10 nucleobases continuas, que preferentemente comprende o consiste en unidades de ADN.

15 En un oligonucleótido gapmer, se prefiere que cualquier desapareamiento esté localizado hacia el extremo 5' o 3' del gapmer. Por tanto, se prefiere que en un oligonucleótido gapmer que comprende desapareamientos con el ARNm diana, que dichos desapareamientos estén localizados en las regiones 5' (A) y/o 3' (C) y/o dichos desapareamientos estén entre la unidad de nucleótido 5' o 3' de dicho oligonucleótido gapmer y molécula diana.

20 Preferentemente, el gapmer, de fórmula A-B-C, comprende además una región adicional, D, que consiste en o comprende, preferentemente consiste en, uno o más restos de azúcares de ADN terminales de la región 3' (C) del compuesto oligomérico, tales como entre uno y tres restos de azúcares de ADN, incluyendo entre 1 y 2 restos de azúcares de ADN, más preferentemente 1 resto de azúcar de ADN.

Shortmers

25 La solicitud provisional de Estados Unidos 60/977409, se refiere a oligonucleótidos "shortmer", que, en una realización particularmente, son compuestos oligoméricos preferidos de acuerdo con la presente invención.

30 En una realización el oligómero que consiste en una secuencia de nucleobases contiguas de un total de 10, 11, 12, 13 o 14 unidades de nucleobases, en el que la secuencia de nucleobases contiguas es de fórmula (5' - 3'), A-B-C, u opcionalmente A-B-C-D, en la que: A consiste en 1, 2 o 3 unidades de LNA; B consiste en 7, 8 o 9 unidades de nucleobases contiguas que son capaces de reclutar RNAsaH cuando se forman en una doble cadena con una molécula de ARN complementaria (tal como una diana de ARNm); y C consiste en 1, 2 o 3 unidades de LNA. Cuando está presente, D consiste en una única unidad de ADN. En una realización, no hay ninguna región D. En una realización A consiste en 1 unidad de LNA. En una realización A consiste en 2 unidades de LNA. En una realización A consiste en 3 unidades de LNA. En una realización C consiste en 1 unidad de LNA. En una realización C consiste en 2 unidades de LNA. En una realización C consiste en 3 unidades de LNA. En una realización B consiste en 7 unidades de nucleobases. En una realización B consiste en 8 unidades de nucleobases. En una realización B consiste en 9 unidades de nucleobases. En una realización B comprende entre 1 y 9 unidades de ADN, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de ADN. En una realización B consiste en unidades de ADN. En una realización B comprende al menos una unidad de LNA que es la configuración alfa-L, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 unidades de LNA en la configuración alfa-L. En una realización B comprende al menos una unidad de alfa-L-oxi LNA o en la que todas las unidades de LNA en la configuración alfa-L son unidades de alfa-L-oxi LNA. En una realización el número de nucleobases en A-B-C se selecciona del grupo que consiste en: 1-8-2, 2-8-1, 2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2. En una realización el número de nucleobases en A-B-C se selecciona del grupo que consiste en: 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 3-9-2 y 2-9-3. En una realización el número de nucleobases en A-B-C se selecciona del grupo que consiste en: 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4 y 4-7-3. En una realización tanto A como C consisten ambos en dos unidades de LNA cada una, y B consiste en 8 unidades de nucleobases, preferentemente unidades de ADN. En una realización las unidades de LNA de A y C se seleccionan independientemente de oxi-LNA, tio-LNA y amino-LNA, en una de las configuraciones beta-D y alfa-L o combinaciones de las mismas. En una realización las unidades de LNA de A y C son beta-D-oxi-LNA. En una realización los enlaces internucleosídicos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en: fosfodiéster, fosforotioato y boranofosfato. En una realización el oligómero comprende al menos un enlace internucleosídico de fosforotioato. En una realización los enlaces internucleosídicos adyacentes a o entre unidades de ADN son enlaces de fosforotioato. En una realización los enlaces entre al menos un par de unidades de LNA consecutivos, tales como 2 unidades de LNA en la región A o C, es un enlace de fosfodiéster. En una realización los enlaces entre unidades de LNA consecutivas tales como 2 unidades de LNA en la región A y C, son enlaces fosfodiéster. En una realización todos los enlaces internucleosídicos son enlaces de fosforotioato.

Los enlaces internucleosídicos adecuados incluyen los enumerados en el documento WO2007/031091, por ejemplo los enlaces internucleosídicos enumerados en el primer párrafo de la página 34 del documento WO2007/031091.

60 Pueden preferirse enlaces internucleosídicos que contienen azufre (S) adecuados como se ha proporcionado anteriormente. También se prefieren enlaces internucleosídicos de fosforotioato, particularmente para la región de hueco (B) de gapmer. También pueden usarse enlaces de fosforotioato para las regiones flanqueantes (A y C, y para unir C con D, y D).

65 Las regiones A, B y C pueden comprender, sin embargo, enlaces internucleosídicos distintos de fosforotioato, tales como enlaces de fosfodiéster, particularmente, por ejemplo cuando el uso de análogos de nucleótidos protege los

enlaces internucleosídicos dentro de regiones A y C de degradación por endonucleasa, tal como cuando las regiones A y C comprenden nucleobases de LNA.

5 Los enlaces internucleobases en el oligómero pueden ser fosfodiéster, fosforotioato o boranofosfato para permitir la escisión por RNasa H de ARN diana. Se prefiere fosforotioato, para resistencia a nucleasa mejorada y otras razones, tales como facilidad de fabricación.

10 En un aspecto del oligómero de la invención, las nucleobases (nucleótidos y/o análogos de nucleótidos) se unen entre sí por medio de grupos de fosforotioato.

15 En algunas realizaciones la región A comprende al menos un enlace de fosfodiéster entre dos unidades de análogos de nucleótidos, o una unidad de análogo de nucleótido y una unidad de nucleobase de la región B. En algunas realizaciones la región C comprende al menos un enlace de fosfodiéster entre dos unidades de análogos de nucleótidos, o una unidad de análogo de nucleótido y una unidad de nucleobase de la región B.

20 En algunas realizaciones, la región C comprende al menos un enlace de fosfodiéster entre una unidad de análogo de nucleótido y una unidad de nucleobase de la región D.

25 En algunas realizaciones el enlace internucleobase entre el análogo de nucleótidos 3' de la región A y la nucleobase 5' de la región B es un fosfodiéster.

En algunas realizaciones el enlace internucleobase entre la nucleobase 3' de la región B y el análogo de nucleótido 5' de la región C es un fosfodiéster.

30 En algunas realizaciones el enlace internucleobase entre los dos análogos de nucleótidos adyacentes en el extremo 5' de la región A es fosfodiéster.

En algunas realizaciones el enlace internucleobase entre los dos análogos de nucleótidos adyacentes en el extremo 3' de la región C es fosfodiéster.

35 En algunas realizaciones el enlace internucleobase entre los dos análogos de nucleótidos adyacentes en el extremo 3' de la región A es fosfodiéster.

En algunas realizaciones el enlace internucleobase entre los dos análogos de nucleótidos adyacentes en el extremo 5' de la región C es fosfodiéster.

40 En algunas realizaciones la región A tiene una longitud de 4 análogos de nucleótidos y el enlace internucleobase entre los dos análogos de nucleótidos medios de la región A es fosfodiéster.

En algunas realizaciones la región C tiene una longitud de 4 análogos de nucleótidos y el enlace internucleobase entre los dos análogos de nucleótidos medios de la región C es fosfodiéster.

45 En algunas realizaciones todos los enlaces internucleobase entre análogos de nucleótidos presentes en el compuesto de la invención son fosfodiéster.

En algunas realizaciones, tales como las realizaciones indicadas anteriormente, cuando sea adecuado y no se indique específicamente, todos los enlaces internucleobases restantes son fosfodiéster o fosforotioato, o una mezcla de los mismos.

50 En algunas realizaciones todos los grupos de enlace internucleobase son fosforotioato.

55 Cuando se hace referencia a secuencias oligonucleotídicas de gapmer específicas, tales como las proporcionadas en el presente documento se entenderá que, en una realización, cuando los enlaces son enlaces fosforotioato, pueden usarse enlaces alternativos, tales como los desvelados en el presente documento, por ejemplo pueden usarse enlaces fosfato (fosfodiéster), particularmente para enlaces entre unidades de análogos de nucleótidos, tales como LNA. De forma similar, cuando se hace referencia a secuencias polinucleotídicas de gapmer específicas, tales como las proporcionadas en el presente documento, cuando se anotan los restos C como citosina 5'metil modificada, en una realización, una o más de las C presentes en el oligonucleótido pueden ser restos de C no modificados.

60 *Método de identificación y preparación de compuestos de la invención:*

65 Los compuestos de la invención, que modulan la expresión de la diana, pueden identificarse mediante experimentación o mediante diseño racional basándose en la información de secuencia en la diana y conocimientos técnicos sobre cómo diseñar mejor un compuesto oligomérico contra una diana deseada. Las secuencias de estos compuestos son realizaciones preferidas de la invención. De forma similar, los motivos de secuencia en la diana

para los que esos compuestos oligoméricos preferidos son complementarios (denominados "puntos calientes") son sitios preferidos para dirección.

En muchos casos la identificación de un compuesto oligomérico, tal como un oligonucleótido LNA, eficaz en la modulación de la expresión o actividad de PCSK9 *in vivo* o clínicamente se basa en información de secuencia en el gen diana (tal como SEQ ID NO 2). Sin embargo, un experto habitual en la materia apreciará que dichos compuestos oligoméricos también pueden identificarse mediante ensayos empíricos. También están dentro del alcance de la invención compuestos oligoméricos que tienen, por ejemplo, menos homología de secuencia, más o menos nucleótidos modificados, o longitudes mayores o menores, en comparación con los de las realizaciones preferidas, pero que no obstante demuestran respuestas en tratamientos químicos. Los ejemplos proporcionan métodos adecuados para realizar ensayos empíricos.

En una realización preferida, el compuesto de la invención comprende una subsecuencia o una secuencia de nucleobases contiguas que tiene al menos 10, tal como al menos 11, tal como al menos 12, tal como al menos 14, tal como al menos 16, tal como al menos 18, tal como 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleobases contiguas que son 100 % complementarias con ácidos nucleicos tanto humanos como de ratón, o tanto humanos como de rata, o tanto humanos como de mono, o humanos, de ratón y de mono o humanos, de rata y de mono que codifican PCSK9. En una realización la secuencia de polinucleobases del compuesto es 100 % complementaria con ácidos nucleicos tanto humanos como de ratón, tanto humanos como de rata, o tanto humanos como de mono, o humanos, de ratón y de mono o humanos, de rata y de mono que codifican PCSK9. En una realización, cuando se hace referencia a compuestos de la invención que son 100 % complementarios con más de una especie de mamífero como se ha enumerado anteriormente, pueden existir uno o dos desapareamientos entre 1 o más de las secuencias, aunque se prefiere que no haya desapareamientos. La Figura 17 ilustra un alineamiento entre los ácidos nucleicos humanos y de ratón que codifican los polipéptidos de PCSK9 humanos y de ratón respectivos. La Tabla 1 proporciona polinucleótidos de PCSK9 adecuados y los polipéptidos correspondientes proporcionados por los números de referencia de Genbank del NCBI, ciertas variantes alélicas conocidas y homólogos conocidos de otras especies de mamífero pueden identificarse fácilmente realizando búsquedas de BLAST usando las secuencias a las que se hace referencia en la Tabla 1.

Tabla 1

	Ácido nucleico (secuencia de ARNm/ADNc)	Polipéptido(deducido)
Ser humano	NM_174936	NP_777596
Ratón	NM_153565	NP_705793.1
Rata	NM_199253	NP_954862.2
Chimpancé	NC_006468 (genómico - ARNm anotado)	XP_001154126
Mono (macaco rhesus)	BV166576	

La homología de aminoácidos y polinucleótidos puede determinarse usando algoritmo ClustalW usando ajustes convencionales: véase <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>, método: EMBOSS:agua (local): hueco abierto = 10,0, extensión de hueco = 0,5, usando Blosum 62 (proteína), o DNFull para secuencias de nucleótidos. Como se ilustra en la Figura 17, dichos alineamientos también pueden usarse para identificar regiones de los ácidos nucleicos que codifican PCSK9 de ser humano y una especie de mamífero diferente, tal como mono, ratón y/o rata, en los que hay suficientes tramos de complementariedad de ácido nucleico para permitir el diseño de oligonucleótidos que se dirigen tanto a ácido nucleico diana de PCSK9 humano como a los ácidos nucleicos correspondientes presentes en las diferentes especies de mamífero, tales como regiones de al menos 10, tal como al menos 12, tal como al menos 14, tal como al menos 16, tal como al menos 18, tal como 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 nucleobases contiguas que son 100 % complementarias tanto con el ácido nucleico que codifica PCSK9 de seres humanos como con el ácido nucleico o los ácidos nucleicos que codifican PCSK9 de las diferentes especies de mamífero.

Definiciones

Cuando se determina la "homología" entre los compuestos oligoméricos de la invención (o subsecuencia o secuencia de nucleobases contiguas combinada) y el ácido nucleico que codifica la PCSK9 de mamífero, tal como los desvelados en el presente documento (incluyendo SEQ ID No 2), la determinación de homología puede realizarse por un alineamiento sencillo con la secuencia de nucleobases correspondiente del compuesto de la invención y la región correspondiente del ácido nucleico que codifica la PCSK9 de mamífero (o ácido nucleico diana), y la homología se determina contando el número de bases que se alinean y dividiendo por el número total de bases contiguas en el compuesto de la invención, y multiplicando por 100. En dicha comparación, si existen huecos, es preferible que dichos huecos sean únicamente desapareamientos en lugar de áreas en las que el número de nucleobases dentro del hueco difieren entre la secuencia de nucleobases de la invención y el ácido nucleico diana.

Las expresiones "localizado dentro de" y "correspondiente a" / "corresponde a" se refieren a la comparación entre la secuencia de nucleobases del oligómero o secuencia de nucleobases contiguas y la secuencia de nucleótidos equivalente de la diana de ácido nucleico tal como el ARNm que codifica la proteína diana de PCSK9, tal como SEQ ID NO 2, o el complemento inverso de la diana de ácido nucleico. Los análogos de nucleótidos se comparan

directamente con sus nucleótidos equivalentes o correspondientes.

Se pretende que las expresiones "análogo de nucleótido correspondiente" y "nucleótido correspondiente" indiquen que la nucleobase en el análogo de nucleótido y el nucleótido son idénticos. Por ejemplo, cuando la unidad de 2-desoxirribosa del nucleótido se une con una adenina, el "análogo de nucleótido correspondiente" contiene una unidad de pentosa (diferente de 2-desoxirribosa) unida a una adenina.

El término "continuo" en relación con una secuencia de nucleobases, es intercambiable con el término "continuo".

El término "nucleobase" se usa como un término colectivo que abarca tanto nucleótidos como análogos de nucleótidos. Una secuencia de nucleobases es una secuencia que comprende al menos dos nucleótidos o análogos de nucleótidos. En una realización la secuencia de nucleobases puede comprender solamente nucleótidos, tales como unidades de ADN, en una realización alternativa, la secuencia de nucleobases puede comprender solamente análogos de nucleótidos, tales como unidades de LNA.

La expresión "ácido nucleico" se define como una molécula formada por enlace covalente de dos o más nucleótidos.

Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento.

Las siguientes expresiones se usan como se definen en el documento WO2007/031091: "nucleótido", "análogo de nucleótido", "localizado dentro de", "correspondiente a"/ "corresponde a", "análogo de nucleótido correspondiente" y "nucleótido correspondiente", "nucleobase", "ácido nucleico" y "polinucleótido", "compuesto" cuando se usa en el contexto de un "compuesto de la invención", "compuesto oligomérico", "oligonucleótido", "oligonucleótido antisentido", y "oligo", "unidad", "LNA", "al menos uno", "grupo de enlace", "conjugado", "sales farmacéuticamente aceptables", "alquilo C₁₋₄", "gen", "antagonista de ARN", "ARNm", "complementario", "desapareamiento o desapareamientos".

La expresión "ácido nucleico diana", como se usa en el presente documento se refiere al ADN que codifica polipéptido de PCSK9 humano, y ácidos nucleicos de ARN derivados del mismo, preferentemente ARNm, tal como pre-ARNm, aunque preferentemente ARNm maduro. En una realización, por ejemplo cuando se usa en investigación o diagnóstico el "ácido nucleico diana" puede ser un ADNc o un oligonucleótido sintético derivado de las dianas de ácido nucleico de ADN o ARN anteriores. El compuesto oligomérico de acuerdo con la invención es preferentemente capaz de hibridar con el ácido nucleico diana.

La expresión "variante de origen natural del mismo" se refiere a variantes del polipéptido de PCSK9 de secuencia de ácido nucleico que existen en la naturaleza dentro del grupo taxonómico definido, tal como mamífero, tal como ratón, rata, mono, chimpancé y preferentemente ser humano. Típicamente cuando se hace referencia a "variantes de origen natural" de un polinucleótido la expresión también puede abarcar variantes del ADN genómico que codifica PCSK9 que se encuentra en el locus NARC1, o un locus directamente derivado del locus NARC-1, por ejemplo mediante translocación o duplicación cromosómica, y el ARN, tal como ARNm derivado del mismo. Cuando se hace referencia a una secuencia polipeptídica específica, por ejemplo SEQ ID NO 1, la expresión también incluye formas de origen natural de la proteína que pueden por lo tanto procesarse, por ejemplo mediante modificaciones co o postraduccionales, tales como escisión de péptido señal, escisión proteolítica, glucosilación, etc.

Se prefiere que el compuesto de acuerdo con la invención sea una molécula lineal o se sintetice como una molécula lineal.

Se pretende que la expresión "grupo de enlace" signifique un grupo capaz de acoplar covalentemente entre sí dos nucleótidos, dos análogos de nucleótidos, y un nucleótido y un análogo de nucleótido, etc. Los ejemplos específicos y preferidos incluyen grupos fosfato y grupos fosforotioato.

En el presente contexto se pretende que el término "conjugado" indique una molécula heterogénea formada por la unión covalente de un compuesto como se describe en el presente documento (es decir un compuesto que comprende una secuencia de análogos de nucleótidos) con uno o más restos no nucleotídicos/ no análogos de nucleótidos o no polinucleotídicos. Los ejemplos de restos no nucleotídicos o no polinucleotídicos incluyen agentes macromoleculares tales como proteínas, cadenas de ácidos grasos, restos de azúcares, glucoproteínas, polímeros o combinaciones de los mismos. Típicamente las proteínas pueden ser anticuerpos para una proteína diana. Los polímeros típicos pueden ser polietilenglicol. Cuando el compuesto de la invención consiste en una secuencia de nucleobases puede, en una realización adicional comprender una parte no nucleobase, tal como los conjugados anteriores.

La expresión "al menos uno" comprende los números enteros mayores que o iguales a 1, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y así sucesivamente.

En una realización, tal como cuando se hace referencia a las dianas de ácido nucleico o proteínas de los compuestos de la invención, la expresión "al menos uno" incluye las expresiones "al menos dos" y "al menos tres" y

"al menos cuatro", de forma similar la expresión "al menos dos" puede comprender las expresiones "al menos tres" y "al menos cuatro".

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales que conservan la actividad biológica deseada de los compuestos identificados en el presente documento y muestran efectos toxicológicos no deseados mínimos. Pueden formarse ejemplos no limitantes de dichas sales con aminoácidos orgánicos y sales de adición de bases formadas con cationes metálicos tales como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio, sodio, potasio y similares, o con un catión formado de amoníaco, *N,N*-dibenciletilen-diamina, *D*-glucosamina, tetraetilamonio o etilendiamina; o (c) 10 combinaciones de (a) y (b); por ejemplo, una sal de tanato de cinc o similares.

En el presente contexto, se pretende que la expresión "alquilo C1-4 " signifique una cadena de hidrocarburo lineal o ramificada saturada en la que la cadena tiene de uno a cuatro átomos de carbono, tales como metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo y *terc*-butilo.

15 Como se usa en el presente documento, el término "gen" significa el gen que incluye exones, intrones, regiones 5' y 3' no codificantes y elementos reguladores y todas las variantes conocidas en la actualidad de los mismos y cualquier variante adicional, que pueda dilucidarse.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "antagonista de ARN" se refiere a un oligonucleótido que se dirige a cualquier forma de ARN (incluyendo pre-ARNm, ARNm, miARN, ARNip, etc.).

25 La expresión "trastornos relacionados" cuando se hace referencia a hipercolesterolemia se refiere a una o más de las afecciones seleccionadas del grupo que consiste en: aterosclerosis, hiperlipidemia, desequilibrio de colesterol HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia combinada familiar (FCHL), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a estatina, enfermedad de las arterias coronarias (CAD) y enfermedad cardíaca coronaria (CHD).

30 En una realización, la expresión "compuesto oligomérico" se refiere a un oligonucleótido que puede inducir un efecto terapéutico deseado en seres humanos mediante, por ejemplo, unión por enlace de hidrógeno con un ácido nucleico diana. También se prevé que los compuestos oligoméricos desvelados en el presente documento pueden tener aplicaciones no terapéuticas, tales como aplicaciones de diagnóstico.

35 Como se usa en el presente documento, el término "modulación" significa bien un aumento (estimulación) o bien una reducción (inhibición) de la expresión de un gen. En la presente invención, la inhibición es la forma preferida de modulación de la expresión génica y ARNm es una diana preferida.

40 Como se usa en el presente documento, "hibridación" significa enlace de hidrógeno, que puede ser Watson-Crick, Holstein, enlaces de hidrógeno de Holstein invertidos, etc., entre bases de nucleótidos complementarias. Watson y Crick mostraron hace aproximadamente cincuenta años que el ácido desoxirribonucleico (ADN) está compuesto de dos cadenas que se mantienen unidas en una configuración helicoidal mediante enlaces de hidrógeno formados entre nucleobases complementarias opuestas en las dos cadenas. Las cuatro nucleobases, habitualmente halladas en ADN son guanina (G), adenina (A), timina (T) y citosina (C) de las que la nucleobase G se empareja con C, y la nucleobase A se empareja con T. En ARN la nucleobase timina se reemplaza por la nucleobase uracilo (U), que de 45 forma similar a la nucleobase T se empareja con A. Los grupos químicos en las nucleobases que participan en la formación de dobles cadenas convencionales constituyen la cara de Watson-Crick. Hoogsteen mostró un par de años después que las nucleobases purínicas (G y A) además de su cara Watson-Crick tienen una cara Hoogsteen que puede reconocerse desde el exterior de una doble cadena, y usarse para unir oligonucleótidos de pirimidina mediante enlaces de hidrógeno, formando de este modo una estructura de triple hélice.

50 Se prefiere en gran medida que los compuestos de la invención sean capaces de hibridar con el ácido nucleico diana, tal como el ARNm.

55 En una realización preferida, los oligonucleótidos son capaces de hibridar contra el ácido nucleico o los ácidos nucleicos diana, tales como el ARNm o los ARNm de PCSK9 correspondientes, para formar una doble cadena con una T_m de al menos 37 °C, tal como al menos 40 °C, al menos 50 °C, al menos 55 °C o al menos 60 °C. En un aspecto la T_m es de entre 37 °C y 80 °C, tal como entre 50 y 70 °C, o entre 40 y 60 °C, o entre 40 y 70 °C. En una realización, la T_m es menor de 80 °C, tal como menor de 70 °C o menor de 60 °C o menor de 50 °C.

60 *Medición de T_m*

65 Se mezcla una solución 3 μ M del compuesto en fosfato sódico 10 mM/ NaCl 100 mM/ EDTA 0,1 nM, pH 7,0 con su oligonucleótido de ADN o ARN del complemento a una concentración 3 μ M en fosfato sódico 10 mM/ NaCl 100 mM/ EDTA 0,1 nM, pH 7,0 a 90 °C durante un minuto y se permite que se enfríe a temperatura ambiente. La curva de fusión de la doble cadena se determina después midiendo la absorbancia a 260 nm con una velocidad de calentamiento de 1 °C/min en el intervalo de 25 a 95 °C. La T_m se mide como el máximo de la primera derivada de la

curva de fusión.

Conjugados

5 En una realización de la invención el compuesto oligomérico se une a ligandos/conjugados, que pueden usarse, por ejemplo, para aumentar la captación celular de oligonucleótidos antisentido. El documento WO2007/031091 proporciona ligandos y conjugados adecuados.

10 La invención también proporciona un conjugado que comprende el compuesto de acuerdo con la invención como se describe en el presente documento, y al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico unido covalentemente con dicho compuesto. Por lo tanto, en una realización en la que el compuesto de la invención consiste en un ácido nucleico específico, como se desvela en el presente documento, el compuesto también puede comprender al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico (por ejemplo que no comprende uno o más nucleótidos o análogos de nucleótidos) unido covalentemente con dicho compuesto.

15 *Aplicaciones*

Los compuestos oligoméricos de la presente invención pueden utilizarse, por ejemplo, como reactivos de investigación para diagnóstico, terapia y profilaxis.

20 Algunos de los beneficios de utilizar LNA, y métodos para preparar y purificar LNA y oligonucleótidos de LNA se desvelan en el documento WO2007/031091.

25 Los compuestos oligoméricos de la invención, tales como los compuestos oligonucleotídicos que contienen LNA de la presente invención, también pueden utilizarse como reactivos de investigación para diagnóstico, terapia y profilaxis.

30 En investigación, dichos oligonucleótidos antisentido pueden usarse para inhibir específicamente la síntesis de genes de PCSK9 en células y animales experimentales facilitando de este modo el análisis funcional de la diana o una evaluación de su utilidad como una diana para intervención terapéutica.

En diagnóstico los oligonucleótidos antisentido puede usarse para detectar y cuantificar expresión de PCSK9 en células y tejidos por transferencia de Northern, hibridación *in situ* o técnicas similares.

35 Para terapia, un animal o un ser humano, que se sospecha que tiene una enfermedad o un trastorno, que puede tratarse modulando la expresión de PCSK9 se trata administrando compuestos antisentido de acuerdo con la presente invención. Se proporciona además el uso en el tratamiento de un animal, en particular ratón y rata y tratamiento de un ser humano, que se sospecha que tiene o es propenso a una enfermedad o afección, asociado con la expresión de PCSK9 administrando una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos antisentido o composiciones de la invención.

40 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede usarse para tratamiento de afecciones asociadas con niveles anómalos de PCSK9, tales como hipercolesterolemia y trastornos relacionados.

45 También se proporcionan dosificaciones, formulaciones, vías de administración, composiciones, formas de dosificación, combinaciones con otros agentes terapéuticos, formulaciones profarmacológicas adecuados en el documento WO2007/031091, aunque debería reconocerse que los aspectos del documento WO2007/031091 que son solamente aplicables de forma específica al tratamiento del cáncer pueden no ser apropiados en las composiciones terapéuticas/farmacéuticas y métodos de la presente invención.

50 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto o un conjugado como se describe en el presente documento o un conjugado, y un diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable. El documento WO2007/031091 proporciona diluyente, vehículo y adyuvantes farmacéuticamente aceptables adecuados y preferidos.

55 *Composiciones farmacéuticas que comprenden más de un principio activo*

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede comprender además otros principios activos, incluyendo los que se indican como útiles para el tratamiento de hipercolesterolemia y/o trastornos relacionados.

60 Una de dichas clases de compuestos son estatinas. Las estatinas son inhibidores de HMG-CoA reductasa que forman una clase de agentes hipolipidémicos, usados como productos farmacéuticos para reducir los niveles de colesterol en personas en riesgo de enfermedad cardiovascular debido a hipercolesterolemia. Actúan inhibiendo la enzima HMG-CoA reductasa, la enzima que determina la velocidad de síntesis de colesterol. La inhibición de esta enzima en el hígado estimula los receptores de LDL, lo que da como resultado una eliminación aumentada de LDL del torrente sanguíneo y una reducción de los niveles de colesterol en sangre. Los ejemplos de estatinas incluyen

65

Atorvastatin™, Cerivastatin™, Fluvastatin™, Lovastatin™, Mevastatin™, Pravastatin™, Pravastatin™, Rosuvastatin™ y Simvastatin™. El uso combinado del compuesto de la invención y las estatinas puede permitir una reducción de la dosis de las estatinas, superando de este modo los efectos secundarios asociados con la dosificación habitual de estatinas, que incluyen, por ejemplo, mialgias, calambres musculares, síntomas gastrointestinales, trastornos de enzimas hepáticas, miositis, miopatía, rabdomiolisis (la degradación patológica del músculo esquelético) que pueden conducir a insuficiencia renal aguda cuando los productos de degradación muscular dañan los riñones.

Los fibratos, una clase de ácidos carboxílicos anfipáticos es una clase alternativa de compuesto que se combina con frecuencia con el uso de estatina, a pesar de una mayor frecuencia de rabdomiolisis que se ha indicado con el uso combinado de estatinas y fibratos. La composición de acuerdo con la invención puede comprender además por lo tanto fibratos, y opcionalmente estatinas.

La composición de acuerdo con la invención puede comprender además moduladores de apolipoproteína B (Apo-B), particularmente agentes que son capaces de reducir la expresión de la función de Apo-B. Convenientemente, los moduladores de Apo-B pueden ser oligonucleótidos antisentido (por ejemplo oligómeros), tales como los desvelados en los documentos WO 00/97662, WO 03/11887 y WO 2004/44181. Una combinación preferida es con el compuesto ISIS 301012 (ilustrado como SEQ ID NO 13).

La composición de acuerdo con la invención puede comprender además moduladores de la expresión de FABP4, tales como oligonucleótidos antisentido (por ejemplo oligómeros) que se dirigen a FABP4, la composición puede usarse en regulación negativa simultánea de la expresión tanto de FABP4 como de PCSK9, dando como resultado un efecto sinérgico con respecto a colesterol en suero sanguíneo y por lo tanto ventajas cuando se trata la hipercolesterolemia y/o trastornos relacionados. Dichas composiciones que comprenden tanto los compuestos de la invención como moduladores de FABP4, tales como los oligonucleótidos antisentido indicados en el presente documento, también pueden comprender adicionalmente estatinas. La solicitud provisional de Estados Unidos 60/969.016 incorporada por la presente por referencia desvela moduladores de FABP4 adecuados.

También se prevé que la composición puede comprender oligonucleótidos antisentido que comprenden análogos de nucleótidos, tales como los desvelados en el documento WO2007/031081. Los oligonucleótidos de LNA específicos, como se desvela o se destaca que se prefieren en el documento WO2007/031091 son especialmente adecuados para los inventores en la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

La invención también proporciona un kit de partes en el que una primera parte comprende el compuesto, el conjugado y/o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención y una parte adicional comprende un oligonucleótido antisentido capaz de reducir la expresión de Apo-B o FABP4. Se prevé por lo tanto que el kit de partes pueda usarse en un método de tratamiento, como se indica en el presente documento, en el que el método comprende administrar tanto la primera parte como la parte adicional, bien simultáneamente o bien una después de la otra.

Métodos médicos y uso

Las afecciones adicionales que pueden asociarse con niveles anómalos de PCSK9 y que por lo tanto pueden tratarse usando las composiciones, conjugados y compuestos de acuerdo con la invención incluyen trastornos seleccionados del grupo que consiste en: hiperlipoproteinemia, hiperlipoproteinemia familiar de tipo 3 (disbetalipoproteinemia familiar), e hiperalfalipoproteinemia familiar; hiperlipidemia, hiperlipidemias mixtas, hiperlipidemia de tipo lipoproteína múltiple e hiperlipidemia combinada familiar; hipertrigliceridemia, hipertrigliceridemia familiar y lipoproteína lipasa familiar; hipercolesterolemia, hipercolesterolemia resistente a estatina, hipercolesterolemia familiar, hipercolesterolemia poligénica y apolipoproteína B defectuosa familiar; trastornos cardiovasculares incluyendo aterosclerosis y enfermedad de las arterias coronarias; trombosis; enfermedad vascular periférica y obesidad.

Las afecciones adicionales que pueden asociarse con niveles anómalos de PCSK9, y que por lo tanto pueden tratarse usando las composiciones, conjugados y composiciones de acuerdo con la invención incluyen trastornos seleccionados del grupo que consiste en: enfermedad de von Gierke (enfermedad de almacenamiento de glucógeno, tipo I); lipodistrofias (formas congénitas y adquiridas); síndrome de Cushing; enanismo ateloítico sexual (deficiencia de hormona de crecimiento aislada); diabetes mellitus; hipertiroidismo; hipertensión; anorexia nerviosa; síndrome de Werner; porfiria intermitente aguda; cirrosis biliar primaria; obstrucción extra hepática biliar; hepatitis aguda; hepatoma; lupus eritematoso sistémico; gammopatías monoclonales (incluyendo mieloma, mieloma múltiple, macroglobulinemia, y linfoma); endocrinopatías; obesidad; síndrome nefrótico; síndrome metabólico; inflamación; hipotiroidismo; uremia (hiperurecemia); impotencia; enfermedad obstructiva hepática; hipercalcemia idiopática; disglobulinemia; niveles de insulina elevados; síndrome X; contractura de Dupuytren; SIDA; y enfermedad de Alzheimer y demencia.

Los compuestos de la invención pueden usarse en métodos para inhibir la unión de partículas de colesterol con endotelio vascular que comprende la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la

5 invención suficiente para la expresión de PCSK9, y como resultado, la invención también proporciona métodos para reducir el riesgo de: (i) oxidación de partículas de colesterol; (ii) unión de monocitos a endotelio vascular; (iii) diferenciación de monocitos en macrófagos; (iv) ingestión por macrófagos de 30 partículas de lípidos oxidados y liberación de citocinas (incluyendo, pero sin limitación IL-1, TNF-alfa, TGF-beta); (v) formación de plaquetas de lesiones fibroadiposas fibrosas e inflamación; (vi) lesiones endoteliales que conducen a coágulos; y (vii) coágulos que conducen a infarto de miocardio o ictus, que también comprende la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para inhibir la expresión de PCSK9.

10 Los compuestos de la invención pueden usarse en la reducción de la hiperlipidemia asociada con alcoholismo, tabaquismo, uso de anticonceptivos orales, uso de glucocorticoides, uso de agentes bloqueantes beta adrenérgicos o uso de isotretinión (ácido retinoico 13-cis) que comprende la etapa de administrar a un individuo una cantidad de un compuesto de la invención suficiente para inhibir la expresión de PCSK9.

15 La invención proporciona además uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de todas y cada una de las afecciones desveladas en el presente documento.

20 Indicado en general, un aspecto de la invención se dirige al uso de los compuestos en el tratamiento de un mamífero que padece o es susceptible a afecciones asociadas con niveles anómalos de PCSK9, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido dirigido a PCSK9 que comprende una o más unidades de LNA.

25 Un aspecto interesante de la invención se dirige al uso de un compuesto como se define en el presente documento o como conjugado como se define en el presente documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección de acuerdo con lo anterior.

Los métodos de la invención se emplean preferentemente para el tratamiento o la profilaxis contra enfermedades provocadas por niveles anómalos de PCSK9.

30 Además, la invención descrita en el presente documento abarca el uso de los compuestos en la prevención o el tratamiento de una enfermedad que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto oligonucleotídico modulador de PCSK9, incluyendo pero sin limitación altas dosis del oligómero, a un ser humano que necesite dicha terapia. La invención abarca además el uso de un periodo corto de administración de un compuesto oligonucleotídico modulador de PCSK9.

35 En una realización de la invención el compuesto oligonucleotídico se une a ligandos/conjugados. Es una manera de aumentar la captación celular de oligonucleótidos antisentido.

40 Los compuestos oligonucleotídicos de la invención también pueden conjugarse con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, ibuprofeno, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

45 Indicado de manera alternativa, la invención se dirige además al uso de los compuestos en el tratamiento de niveles anómalos de PCSK9, comprendiendo dicho método administrar un compuesto como se define en el presente documento, o un conjugado como se define en el presente documento o una composición farmacéutica como se define en el presente documento a un paciente que lo necesite y que comprende además la administración de un agente quimioterapéutico adicional. Dicha administración adicional puede ser tal que el agente quimioterapéutico adicional se conjugue con el compuesto de la invención, esté presente en la composición farmacéutica, o se administre en una formulación separada.

50 La invención también se refiere a un compuesto, una composición o un conjugado como se define en el presente documento para su uso como un medicamento.

55 La invención se refiere además al uso de un compuesto, una composición o un conjugado como se define en el presente documento para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de niveles anómalos de PCSK9. Típicamente, dichos niveles anómalos de PCSK9 están en forma de, o provocan, o se caracterizan por, hipercolesterolemia y trastornos relacionados, tales como aterosclerosis o hiperlipidemia. Además, la invención se refiere al uso de los compuestos en el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad o afección seleccionada de hipercolesterolemia y trastornos relacionados, tales como aterosclerosis e hiperlipidemia, comprendiendo el método la etapa de administrar una composición farmacéutica como se define en el presente documento al sujeto que lo necesite. Preferentemente, la composición farmacéutica se administra por vía oral.

60 Los ejemplos de enfermedades relacionadas también incluyen diferentes tipos de desequilibrio de colesterol HDL/LDL; dislipidemias, por ejemplo hiperlipidemia combinada familiar (FCHL), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a estatina; enfermedad de las arterias coronarias (CAD), enfermedad cardiaca coronaria (CHD), aterosclerosis.

65

Se reconoce que cuando la composición de acuerdo con la invención también comprende moduladores de la expresión de Apo-B100 o FABP4, tales como oligonucleótidos antisentido que se dirigen a ApoB-100 o FABP4, la composición puede usarse en regulación negativa simultánea de la expresión tanto de PCSK9 como de ApoB-100 (o FABP4), dando como resultado un efecto sinérgico con respecto a colesterol en suero sanguíneo y por lo tanto ventajas cuando se trata la hipercolesterolemia y/o trastornos relacionados. Dichas composiciones que comprenden tanto los compuestos de la invención como moduladores de ApoB o FABP4, tales como los oligonucleótidos antisentido indicados en el presente documento, también pueden comprender además estatinas.

Tabla 2: diseños de compuestos específicos/ oligonucleótidos antisentido de LNA. Obsérvese que los números indicados en los Ejemplos y las Figuras se refieren a los números de ID de compuesto. La Tabla anterior proporciona tanto n.º de ID de compuesto, como la SEQ ID correspondiente usada en el listado de secuencias y el motivo ID, también indicado en el listado de secuencias. Se muestran motivos de secuencias de oligómeros adicionales de acuerdo con la invención en la Tabla 3.

Compuesto ID n.º	Longitud	Secuencia	SEQ ID	SEQ ID de motivo
262	16	5'- G _s ^{om} C _s ^{om} C _s ^o ts g _s ts c _s ts g _s t _s g _s g _s a _s A _s ^o C _s ^{om} C ^o -3'	10	3
80	14	5'- G _s ^o A _s ^o G _s ^o t _s a _s g _s a _s g _s g _s c _s a _s G _s ^o G _s ^{om} C ^o -3'	20	30
338	16	5'- mC _s ^o A _s ^o A _s ^o g _s t _s t _s a _s c _s a _s a _s a _s g _s mC _s ^o A _s ^o A ^o -3'	11	4
341	16	5'- G _s ^o A _s ^o G _s ^o a _s t _s a _s c _s a _s c _s t _s c _s c _s A _s ^{om} C _s ^{om} C ^o -3'	9	5
301	16	5'- T _s ^{om} C _s ^{om} C _s ^o t _s c _s a _s g _s g _s g _s a _s a _s c _s c _s A _s ^o G _s ^o G ^o -3'	21	31
317	16	5'- mC _s ^o T _s ^o G _s ^o g _s a _s g _s c _s a _s g _s c _s t _s c _s a _s G _s ^{om} C _s ^o A ^o -3'	22	32
323	16	5'- mC _s ^o A _s ^o T _s ^o g _s g _s c _s a _s g _s c _s a _s g _s g _s a _s A _s ^o G _s ^{om} C ^o -3'	23	33
98	14	5'- G _s ^o A _s ^o T _s ^o a _s c _s a _s c _s c _s t _s c _s c _s A _s ^{om} C _s om C ^o -3'	24	34
101	14	5'- mC _s ^o T _s ^o G _s ^o t _s c _s t _s g _s t _s g _s g _s a _s A _s ^o G _s ^{om} C ^o -3'	25	35
9	13	5'- G _s ^o T _s ^o s ^o c _s t _s g _s t _s g _s g _s a _s a _s G _s ^o C _s ^o G ^o -3'	26	36
11	13	5 A _s ^o T _s ^o g _s a _s g _s g _s g _s t _s g _s c _s c _s mG _s ^{om} C ^o -3'	27	37
16	13	5'- A _s ^o T _s ^o a _s a _s a _s c _s t _s c _s c _s a _s G _s ^o G _s ^{om} C ^o -3'	28	38
18	13	5'- T _s ^o A _s ^o g _s a _s c _s a _s c _s c _s t _s mC _s ^o A _s ^{om} C ^o -3'	29	39

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de monómeros

Los componentes básicos de monómeros de LNA y derivados de los mismos se prepararon siguiendo los procedimientos publicados y las referencias citadas en los mismos, véase:

Documento WO 03/095467 A1

D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, T. Koch (2002) Preparation of LNA Phosphoramidites, *Synthesis* 6, 802-808.

M. D. Sørensen, L. Kværnø, T. Bryld, A. E. Håkansson, B. Verbeure, G. Gaubert, P. Herdewijn, J. Wengel (2002) α-L-ribo-configured Locked Nucleic Acid (α-l-LNA): Synthesis and Properties, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 2164-2176.

S. K. Singh, R. Kumar, J. Wengel (1998) Synthesis of Novel Bicyclo[2.2.1] Ribonucleosides: 2'-Amino- and 2'-Thio-LNA Monomeric Nucleosides, *J. Org. Chem.* 1998, 63, 6078-6079.

C. Rosenbohm, S. M. Christensen, M. D. Sørensen, D. S. Pedersen, L. E. Larsen, J. Wengel, T. Koch (2003) Synthesis of 2'-amino-LNA: a new strategy, *Org. Biomol. Chem.* 1,655-663.

D. S. Pedersen, T. Koch (2003) Analogues of LNA (Locked Nucleic Acid). Synthesis of the 2'-Thio-LNA Thymine and 5-Methyl Cytosine Phosphoramidites, *Synthesis* 4, 578-582.

Ejemplo 2: Síntesis de oligonucleótidos

Se sintetizaron oligonucleótidos usando el enfoque de fosforamidita en un sintetizador Expedite 8900/MOSS (sistema de síntesis de oligonucleótidos múltiple) a una escala de 1 μ mol o 15 μ moles. Para síntesis a mayor escala se usó un oligo Pilot de Äkta. Al final de la síntesis (DMT-on), los oligonucleótidos se escindieron del soporte sólido usando amoniaco acuoso durante 1-2 h a temperatura ambiente, y además se desprotegeron durante 4 h a 65 °C. Los oligonucleótidos se purificaron por HPLC de fase inversa (RP-HPLC). Después de la retirada del grupo DMT, los oligonucleótidos se caracterizaron mediante AE-HPLC, RP-HPLC y CGE y la masa molecular se confirmó adicionalmente mediante ESI-MS. Véase posteriormente para más detalles.

Preparación del soporte sólido de LNA:

Preparación del succinil hemiéster de LNA

Se disolvieron monómero de 5'-O-Dmt-3'-hidroxi-LNA (500 mg), anhídrido succínico (1,2 eq.) y DMAP (1,2 eq.) en DCM (35 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Después de extracciones con NaH_2PO_4 0,1 M pH 5,5 (2x) y salmuera (1x), la capa orgánica se secó adicionalmente con Na_2SO_4 anhídrido filtrado y evaporado. El derivado de hemiéster se obtuvo en rendimiento del 95 % y se usó sin ninguna purificación adicional.

Preparación del soporte de LNA

El derivado de hemiéster preparado anteriormente (90 μ moles) se disolvió en una cantidad mínima de DMF, DIEA y pyBOP (90 μ moles) se añadieron y se mezclaron juntos durante 1 min. Esta mezcla preactivada se combinó con LCAA-CPG (500 Å, tamaño de malla de 80-120, 300 mg) en un sintetizador manual y se agitó. Después de 1,5 h a temperatura ambiente, el soporte se separó por filtrado y se lavó con DMF, DCM y MeOH. Después de secar, se determinó que la carga era de 57 μ mol/g (véase Tom Brown, Dorcas J. S. Brown. Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis. En: F. Eckstein, editor. Oligonucleotides and Analogues A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1991: 13-14).

Elongación del oligonucleótido

El acoplamiento de fosforamiditas (A(bz), G(ibu), 5-metil-C(bz)) o T- β -cianoetil-fosforamidita) se realiza usando una solución de 0,1 M de la amidita protegida por 5'-O-DMT en acetonitrilo y DCI (4,5-dicianoimidazol) en acetonitrilo (0,25 M) como activador. La tiolación se lleva a cabo usando cloruro de xantano (0,01 M en acetonitrilo: piridina 10 %). El resto de los reactivos son los típicamente usados para síntesis de oligonucleótidos. El protocolo proporcionado por el proveedor se optimizó convenientemente.

Purificación mediante RP-HPLC:

Columna: Xterra RP₁₈
Caudal: 3 ml/min
Tampones: acetato de amonio 0,1 M pH 8 y acetonitrilo

Abreviaturas

DMT: Dimetoxitritilo
DCI: 4,5-dicianoimidazol
DMAP: 4-dimetilaminopiridina
DCM: Diclorometano
DMF: Dimetilformamida
TF: Tetrahidrofurano
DIEA: *N,N*-diisopropiletilamina
PyBOP: Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio
Bz: Benzoílo
Ibu: Isobutirilo

Ejemplo 3: Diseño del compuesto oligonucleotídico

Véase Tabla 2 y 3 (posteriores) – Las letras en mayúsculas indican unidades ribonucleotídicas y el subíndice "s" representa unidades ribonucleotídicas 2'-O-metil modificadas.

En una realización de la invención, SEQ ID NO: 3 y 4 contienen al menos 3 nucleótidos de LNA, tales como 6 (7 u 8) nucleótidos de LNA como en SEQ ID NO: 3 y 4.

Ejemplo 4: Estabilidad de compuestos de LNA en plasma humano o de rata

Se ensayó la estabilidad de oligonucleótidos de LNA en plasma de seres humanos o ratas (también podría ser plasma de ratón, de mono o de perro). En 45 µl de plasma se añaden 5 µl de oligonucleótido (a una concentración final de 20 µM). Los oligos se incuban en plasma durante tiempos que varían de 0 h a 96 h a 37 °C (el plasma se ensaya con respecto a actividad nucleasa hasta 96 h y no muestra ninguna diferencia en el patrón de escisión de nucleasa). En el tiempo indicado la muestra se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido. Se diluyeron 2 µl (igual a 40 pmoles) de oligonucleótido en plasma añadiendo 15 µl de agua y 3 µl de colorantes de carga 6x (Invitrogen). Como marcador se usa una escalera de 10 pb (Invitrogen 10821-015). A 1 µl de escalera se añade 1 µl de carga 6x y 4 µl de agua. Las muestras se mezclaron, se calentaron a 65 °C durante 10 min y se cargaron en un gel preprocesado (acrilamida al 16 %, UREA 7 M, TBE 1x, preprocesado a 50 W durante 1 h) y se ejecutó a 50-60 W durante 2 ½ h. posteriormente el gel se tiñó con SyBR oro 1x (molecular probes) en TBE 1x durante 15 min. Las bandas se visualizaron usando un detector de imagen fotoestimulable de Biorad.

Ejemplo 5: Modelo in vitro: cultivo celular

El efecto de los compuestos antisentido en la expresión de ácido nucleico diana puede ensayarse en cualquiera de una diversidad de tipos celulares siempre que el ácido nucleico diana esté presente a niveles medibles. La diana puede expresarse de forma endógena o mediante transfección transitoria o estable de un ácido nucleico que codifica dicho ácido nucleico.

El nivel de expresión de ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando, por ejemplo, análisis de transferencia de Northern, PCR cuantitativa, ensayos de protección de ribonucleasa. Los siguientes tipos celulares se proporcionan para fines ilustrativos, pero pueden usarse rutinariamente otros tipos celulares, siempre que la diana se exprese en el tipo celular elegido.

Se cultivaron células en el medio apropiado como se describe posteriormente y se mantuvieron a 37 °C a 95-98 % de humedad y CO₂ 5 %. Las células se pasaron rutinariamente 2-3 veces por semana.

Huh-7: se obtuvo la línea celular de hígado humano Huh-7 de ATCC y se cultivó en MEM de Eagle (Sigma) con FBS 10 % + Glutamax I + aminoácidos no esenciales + gentamicina.

Ejemplo 6: Modelo in vitro: tratamiento con oligonucleótido antisentido

Cultivo celular y transfección: se sembraron células Huh-7 y Hepa 1-6 en placas de 6 pocillos a 37 °C (CO₂ 5 %) en medio de cultivo complementado con FBS 10%, Glutamax I y gentamicina. Cuando las células fueron confluentes a 60-70 %, se transfectaron por duplicado con concentraciones diferentes de oligonucleótidos (0,04 – 25 nM) usando Lipofectamine 2000 (5 µg/ml). Las transfecciones se llevaron a cabo esencialmente como se describe en Dean *et al.* (1994, JBC 269: 16416-16424). Brevemente, las células se incubaron durante 10 min. Con Lipofectamine en OptiMEM seguido de adición de oligonucleótido hasta un volumen total de 0,5 ml de mezcla de transfección por pocillo. Después de 4 horas, se retiró la mezcla de transfección, las células se lavaron y se cultivaron a 37 °C durante aproximadamente 20 horas (análisis de ARNm y análisis de proteínas en el medio de cultivo apropiado). Las células se recogieron después para análisis de proteínas y ARN.

*Ejemplo 7: Modelo in vitro: extracción de ARN y síntesis de ADNc**Aislamiento de ARN total*

Se aisló ARN total usando mini kit RNeasy (Qiagen). Las células se lavaron con PBS, y se añadió directamente a los pocillos tampón de lisis celular (RTL, Qiagen) complementado con mercaptoetanol 1 %. Después de algunos minutos, las muestras se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Síntesis de primera cadena

Se realizó síntesis de primera cadena usando kit de transcriptasa inversa OmniScript o transcriptasa inversa M-MLV (esencialmente como se describe por el fabricante (Ambion)) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen). Cuando se usaron 0,5 µg de transcriptasa inversa OmniScript el ARN total de cada muestra se ajustó a 12 µl y se mezcló con 0,2 µl de poli (dT)₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl) (Life Technologies), 2 µl de mezcla de dNTP (5 mM cada uno), 2 µl de tampón RT 10x, 0,5 µl de inhibidor de RNasa RNAGuard™ (33 unidades/ml, Amersham) y 1 µl de transcriptasa inversa OmniScript seguido de incubación a 37 °C durante 60 min. e inactivación por calor a 93 °C durante 5 min.

Cuando se realizó síntesis de primera cadena usando decámeros aleatorios y transcriptasa inversa M-MLV (esencialmente como se describe por el fabricante (Ambion)) 0,25 µg se ajustó el ARN total de cada muestra a 10,8 µl en H₂O. Se añadieron 2 µl de decámeros y 2 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM cada uno). Las muestras se calentaron a 70 °C durante 3 min. y se enfriaron inmediatamente en agua helada y se añadieron 3,25 µl de una

mezcla que contenía (2 µl de tampón RT 10x; 1 µl de transcriptasa inversa M-MLV; 0,25 µl de inhibidor de RNasa). Se sintetizó ADNc a 42 °C durante 60 min seguido de etapa de inactivación por calentamiento a 95 °C durante 10 min y se enfrió finalmente a 4 °C.

5 *Ejemplo 8: Modelo in vitro e in vivo: análisis de inhibición de oligonucleótidos de PCSK9*

Expresión por PCR en tiempo real

10 La modulación antisentido de la expresión de PCSK9 puede ensayarse de una diversidad de maneras conocidas en la técnica. Por ejemplo, los niveles de ARNm de PCSK9 pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante análisis de transferencia de Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva, o PCR en tiempo real. En la actualidad se prefiere la PCR cuantitativa en tiempo real. Puede realizarse análisis de ARN en ARN celular total o ARNm.

15 Los métodos de aislamiento de ARN y análisis de ARN tales como análisis de transferencia de Northern son rutinarios en la técnica y se enseñan, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons.

Puede conseguirse convenientemente (PCR) cuantitativa en tiempo real usando el sistema de detección de PCR en tiempo real multicolor iQ disponible en el mercado de BioRAD. La PCR cuantitativa en tiempo real es una técnica bien conocida en este campo y se enseña por ejemplo en Heid *et al.* Real time quantitative PCR, Genome Research (1996), 6: 986-994.

Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de ARNm de PCSK9

25 Para determinar el nivel de ARNm de PCSK9 humano relativo en muestras tratadas y no tratadas, se usó el ADNc generado en análisis de PCR cuantitativa usando un iCycler de Bio-Rad o sistema de PCR en tiempo real rápido 7500 de Applied Biosystems.

30 Se añadieron 8 µl de ADNc diluido 10 veces a 52 µl de una mezcla que contenía 29,5 µl de supermezcla de qPCR-UDG Platinum (Invitrogen), 19,2 µl de H₂O y 3,0 µl de una PCSK9 humana 20x o ensayo de expresión génica TaqMan de GAPDH (Applied Biosystems). Cada muestra se analizó por duplicado. Programa de PCR: 95 °C durante 20 segundos seguido de 40 ciclos de 95 °C, 3 segundos, 60 °C, 30 segundos.

35 PCSK9 de ratón: la expresión de PCSK9 de ratón se cuantifica usando un ensayo de expresión génica TaqMan de PCSK9 o GAPDH de ratón (Applied Biosystems) a 8 µl de ADNc diluido 10 veces se añaden 52 µl de una mezcla que contiene 29,5 µl de Supermezcla-UDG de qPCR Platinum (Invitrogen), 19,2 µl de H₂O y 3,0 µl de un ensayo de expresión génica TaqMan de PCSK9 o GAPDH de ratón 20x (Applied Biosystems). Cada muestra se analiza por duplicado. Programa de PCR: 95 °C durante 20 segundos seguido de 40 ciclos de 95 °C, 3 segundos, 60 °C, 30 segundos.

40 La expresión de ARNm de PCSK9 se normaliza con respecto a ARNm de Gapdh de ratón que se cuantificó de forma similar usando Q-PCR.

45 Se usan diluciones dobles de ADNc sintetizado a partir de la línea celular de hepatocitos humanos no tratada (Huh-7) (diluida 5 veces y que expresa tanto PCSK9 como Gapdh) para preparar curvas patrón para los ensayos. Se determinaron las cantidades relativas de ARNm de PCSK9 a partir del ciclo de umbral calculado usando el software de sistema de detección en tiempo real iCycler iQ.

50 *Ejemplo 9 Análisis in vitro: respuesta a dosis en cultivo celular (hepatocitos humanos Huh-7)/ inhibición antisentido de expresión de PCSK9 humana*

De acuerdo con la presente invención, se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigirse a regiones diferentes del ARNm de PCSK9 humana. Véase Tabla 2. Se evaluaron compuestos oligonucleotídicos con respecto a su potencial para anular ARNm de PCSK9 en hepatocitos humanos (células Huh-7) después de captación asistida por lípidos de compuestos ID n.º: 9, 16, 18, 98, 101, 262, 301, 317, 323, 338, 341 (Figuras 1-4). El experimento se realizó como se ha descrito en los Ejemplos 5-8. Los resultados mostraron regulación negativa muy potente (60 a ≥ 80 %) con 25 nM para todos los compuestos.

60 *Ejemplo 10 Análisis in vitro: respuesta a dosis en cultivo celular (hepatocito murino Hepa 1-6)/ inhibición antisentido de la expresión de PCSK9 murina*

De acuerdo con la presente invención, se diseñó una serie de oligonucleótidos para dirigirse a regiones diferentes del ARNm de PCSK9 murina. (Véase Tabla 2). Los compuestos oligonucleotídicos se evaluaron con respecto a su potencial para anular ARNm de PCSK9 en hepatocitos murinos (Hepa 1-6) después de captación asistida por lípidos de compuestos ID n.º: 98, 101, 262 y 338 (Figuras 5-6). El experimento se realizó como se ha descrito en los Ejemplos 5-8. Los resultados mostraron regulación negativa muy potente (≥ 60 %) con 25 nM para todos los

compuestos.

Ejemplo 11 Niveles de colesterol en suero de ratón

5 Se midió el nivel de colesterol total en suero usando un ensayo colorimétrico Cholesterol CP de ABX Pentra. El colesterol se mide después de hidrólisis enzimática y oxidación. Se añaden 20 µl de agua a 3 µl de suero. Se añaden 240 µl de reactivo y en un periodo de 15 min este contenido de colesterol se mide a una longitud de onda de 500 nM. Las mediciones en cada animal se realizaron por duplicado. Se realizó una curva patrón usando Multi Cal de ABX Diagnostics.

10 Los niveles de colesterol en las diferentes clases de lipoproteína (VLDL/LDL y HDL) se midieron en suero por ultracentrifugación. El suero se ajustó hasta una densidad de 1,067 g/ml permitiendo separar HDL de las otras lipoproteínas. El colesterol total (ABX Pentra) se mide en cada fracción (superior e inferior) después de centrifugación a aproximadamente 400.000 g durante 4 horas a 15 °C.

15 *Ejemplo 12 Nivel de proteína de receptor de LDL en hígado de ratón*

Transferencia de Western

20 Las muestras de hígado se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se analizaron. Se descongelaron 30 mg de tejido y se homogeneizaron en 300 µl de tampón de extracción de proteínas tisulares T-per (Pierce), complementado con cóctel inhibidor de proteasa Halt (Pierce).

25 La proteína total se midió mediante el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce) usando un patrón de albúmina de acuerdo con el protocolo del fabricante.

30 Se cargaron 25 µg de proteína total de cada muestra en un gel de Bis-Tris 4-12 % con tampón de muestra LDS 4x (NuPAGE, Invitrogen). El gel se procesó durante dos horas a 130 V en MOPS (Invitrogen). Las bandas proteicas se transfirieron a una membrana de PVDF usando un módulo de transferencia de acuerdo con el protocolo convencional (módulo de transferencia XCell II, Invitrogen). La membrana se bloqueó en leche en polvo desnatada al 5 % en PBS 1x durante una noche. Para inmunodetección, la membrana se incubó durante una noche en una solución de bloqueo con anticuerpos primarios de dilución 1:1000 de anticuerpo policlonal de cabra anti LDLR de ratón (R&D Systems) y dilución 1:2000 de anticuerpo monoclonal de ratón anti tubulina (NeoMarkers). Esto se siguió de incubación de dos horas en solución de anticuerpo secundario de dilución 1:2000 de HRP/anticuerpo anti cabra y dilución 1:2000 de HRP/anticuerpo anti ratón (Dako). Las bandas de LDLR y tubulina se visualizaron usando kit de quimioluminiscencia ECL+ detección (Amersham) y un sistema de captura de imágenes VersaDoc5000 (Bio-Rad).

Ejemplo 13 Composición de clase de lipoproteínas en suero medida usando geles Sebia

40 Se usa electroforesis en gel de agarosa en tampón de barbital para separar lipoproteínas según la carga y es uno de los métodos originales para análisis clínico de perfiles de lipoproteínas. Los geles se tiñen habitualmente con un colorante lipófilo tal como Sudan Black. El colorante o los colorantes no distinguirán entre especies de lípidos, por lo tanto el método se limita a proporcionar un "perfil de lipoproteínas general" ya que los colorantes no pueden distinguir entre éster de colesterol y triglicéridos. Sin embargo, el pequeño volumen de muestras, la alta reproducibilidad y la posibilidad de seguir los cambios en los perfiles de lipoproteínas (como porcentaje de lípido/banda) en animales individuales hace a los geles de agarosa una herramienta útil para análisis de lipoproteínas. Se realizan análisis en geles de alta calidad y equipamiento de electroforesis especializado (electroforesis en gel de agarosa de lipoproteína + Lp(a), Sebia, Francia). Se aisló suero de sangre de ratón por centrifugación y las lipoproteínas se separaron en geles Sebia y se cuantificaron usando tinción de Sudan Black seguido de exploración de los geles (Molecular Imager FX) y se analizaron mediante software Quantity One, usando los ajustes de densitometría.

Ejemplo 14 Análisis in vivo: respuesta a dosis de diferentes oligonucleótidos de LNA en ratones hembras C57BL/6.

55 De acuerdo con la presente invención, se diseñaron una serie de oligonucleótidos para dirigirse a regiones diferentes del ARNm de PCSK9 murino. Tres de estos oligonucleótidos se evaluaron con respecto a su regulación negativa potencial en ARNm de PCSK9 en hígado, reducción de colesterol en suero y aumento de la proteína de receptor de LDL en hígado.

60 Se dosificó a hembras C57BL/6 2,5, 5 o 10 mg/kg i.v. del oligonucleótido o solución salina los días 0, 3, 7, 10 y 14 y se sacrificaron el día 16 después de la primera dosis de tratamiento. Se tomaron muestras del hígado para análisis de expresión de ARNm de PCSK9 mediante qPCR (como se ha descrito en el Ejemplo 8). La expresión de ARNm de PCSK9 se reguló negativamente de una manera dependiente de dosis después de dosificar compuestos ID NO 98 y 101 (Figura 7).

65

Se tomaron muestras de sangre en el momento del sacrificio para preparación de suero y se midió el colesterol en el suero como se ha descrito en el Ejemplo 11. El compuesto ID NO 98 mostró tendencia de colesterol total en suero reducido y nivel reducido de colesterol VLDL+LDL, aproximadamente 30 % y ningún efecto en colesterol HDL (Figura 8).

Se esperaba que la regulación negativa del ARNm de PCSK9 tuviera un efecto en el número de receptores de LDL presentados en la superficie de los hepatocitos. Se usó transferencia de Western para examinar la proteína de receptor de LDL en el hígado (Ejemplo 12). El compuesto ID NO 98 dio como resultado un aumento en la proteína de receptor de LDL de aproximadamente 80 % en comparación con el grupo de solución salina (Figura 9).

Ejemplo 15 Análisis in vivo: eficacia de oligonucleótidos de LNA en la regulación negativa de PCSK9 en ratones NMRI hembra.

Se examinaron dos oligonucleótidos que se dirigían a diferentes regiones del ARNm de PCSK9 murina con respecto a potencia para regular negativamente la expresión de ARNm de PCSK9, reducir el colesterol total en suero y aumentar el nivel de proteína de receptor de LDL.

Se dosificaron a los ratones hembras NMRI i.v. 10 mg/kg/dosis de oligonucleótido LNA o solución salina los días 0, 2, 4 y se sacrificaron el día 6. Se tomaron muestras del hígado para análisis de la expresión de ARNm de PCSK9 mediante qPCR (como se ha descrito en el Ejemplo 8). Se redujo la expresión de ARNm de PCSK9 con aproximadamente 70 % después de la dosificación del compuesto ID NO 98 y aproximadamente 30 % de la dosificación del compuesto ID NO 101 (Figura 10). El efecto de esta regulación negativa se observó en el nivel de proteína de receptor de LDL en el hígado; aproximadamente 50 % y 40 % de aumento después de la dosificación de los compuestos ID NO 98 y 101, respectivamente (Figura 11). Este aumento en el receptor de LDL dio como resultado reducción del colesterol en suero de 55 % y 15 % para los compuestos ID NO 98 y 101, respectivamente (Figura 12).

Ejemplo 16 Análisis in vivo: eficacia de oligonucleótidos de LNA para reducir la expresión de ARNm de PCSK9 en C57BL/6 a los que se alimentó con una dieta alta en grasas (HFD) durante 1 o 5 meses antes de la dosificación.

Se alimentó a ratones hembras C57BL/6 con una dieta alta en grasas (HFD) (60 % de energía grasa) durante 5 meses y se alimentó a machos C57BL/6 con una HFD durante 1 mes antes de dosificar oligonucleótidos de LNA a 10 o 15 mg/kg los días 0, 3, 7, 10, 14 y el día de sacrificio 16. Se tomaron muestras de hígado para análisis de la expresión de ARNm de PCSK9 mediante qPCR (como se ha descrito en el Ejemplo 8). La dosificación de los compuestos ID NO 98 y 317 dio como resultado una regulación negativa de la expresión ARNm de PCSK9 (analizada mediante qPCR como se ha descrito en el Ejemplo 8) de aproximadamente 80 % y 60 %, respectivamente, en ratones hembras y aproximadamente 85 % en ratones macho para ambos compuestos (Figura 13). El nivel de proteína de receptor de LDL medido mediante transferencia de Western (descrito en el Ejemplo 12) aumentó aproximadamente 2-3 veces después de dosificar el compuesto ID NO 98 y 20 % después de dosificar el compuesto ID NO 317 a ratones HFD hembra. En ratones macho 15 mg/kg/dosis del compuesto ID NO 98 dieron como resultado un aumento del nivel de proteína de receptor de LDL de 2,5 veces mientras que el compuesto ID NO 317 tuvo solamente efectos menores en el nivel de proteína de receptor de LDL (Figura 14).

Ejemplo 17 Análisis in vivo: eficacia de oligonucleótidos de LNA de 13 unidades para reducir la expresión de ARNm de PCSK9 en ratones NMRI hembra.

Se dosificaron a ratones NMRI hembra 15 mg/kg los días 0, 2 y 4 y se sacrificaron el día 6. Se tomaron muestras del hígado para análisis de la expresión ARNm de PCSK9 mediante qPCR como se ha descrito en el Ejemplo 8. Los oligonucleótidos de 13 unidades; compuestos ID NO 9, 16 y 18 dieron como resultado la reducción de la expresión de ARNm de PCSK9 del 90 %, 70 % y 85 %, respectivamente y el compuesto ID NO 98 de 14 unidades proporcionó 80 % de reducción en ARNm de PCSK9 (Figura 15). La distribución de las diferentes clases de lipoproteínas en suero se determinó después de separación en geles Sebia como se ha descrito en el Ejemplo 13. La distribución entre las diferentes clases (ajustadas al 100 % para cada grupo y presentadas en relación con las otras lipoproteínas en ese grupo) se examinó para los compuestos ID NO 9, 16, 18 y 98. Se observó el mayor efecto para el compuesto ID NO 18 para todas las lipoproteínas (50 % y 65 % de reducción en relación con solución salina para VLDL y LDL, respectivamente, como resultado se aumentó HDL en 60 %) y el compuesto ID NO 98 redujo VLDL en 30 % y en aproximadamente 10 % para LDL en relación con solución salina, y como resultado HDL se aumentó en 20 % (Figura 16).

TABLA 3: Secuencias adicionales de gran interés para síntesis de oligonucleótidos antisentido que se dirigen a PCSK9, tales como oligonucleótidos antisentido LNA.

Inicio de sitio diana	Final del sitio diana	Longitud del oligo	Secuencia diana	Dianas de ARNm humano	Dianas de ARNm murino	Secuencia de oligo	Motivo sc ID NO
1082	1093	12	CGCTCCACAGA	2	2	TCGTGGAAGCG	40
1228	1239	12	CACCCTCATAGG	2	2	CCTATGAGGGTG	41
1244	1255	12	GAGTTTATTGGG	2	2	CCGAATAAACTC	42
1239	1250	12	GCCTGGAGTTTA	2	3	TAAACTCCAGGC	43
1138	1149	12	GGTCAGCGCGCG	2	4	CGGCCGCTGACC	44
1233	1244	12	TCATAGGCCTGG	2	4	CCAGGCCTATGA	45
1230	1241	12	CCCTCATAGGCC	3	1	GGCCTATGAGGG	46
1082	1094	13	CGCTCCACAGAC	1	1	GTCTGTGGAAGCG	47
1139	1151	13	GTCAGCGGCGGG	1	1	CCCGCCGCTGAC	48
1224	1236	13	GCGGCACCCCTCAT	1	1	ATGAGGGTGCCGC	49
1228	1240	13	CACCCTCATAGGC	1	1	GCCTATGAGGGTG	50
1232	1244	13	CTCATAGGCCTGG	1	1	CCAGGCCTATGAG	51
1235	1247	13	ATAGGCCTGGAGT	1	1	ACTCCAGGCCTAT	52
1238	1250	13	GGCCTGGAGTTTA	1	1	TAAACTCCAGGC	53
1239	1251	13	GCCTGGAGTTTAT	1	1	ATAAACTCCAGGC	54
1826	1838	13	GCACACTCGGGGC	1	1	GCCCCGAGTGTGC	55
1989	2001	13	GTAGGGGTGCTA	1	1	TAGACACCCTCAC	56
844	856	13	GAAGTTGCCCCAT	1	1	ATGGGGCAACTTC	57
979	991	13	GGAGGTGTATCTC	1	1	GAGATACACCTCC	58
1233	1245	13	TCATAGGCCTGGA	1	2	TCCAGGCCTATGA	59
1827	1839	13	CACACTCGGGGCC	1	2	GGCCCCGAGTGTG	60
1231	1243	13	CCTCATAGGCCTG	1	3	CAGGCCTATGAGG	61
978	990	13	TGGAGGTGTATCT	1	3	AGATACACCTCCA	62
1603	1615	13	TGCTGCCACCGTG	1	4	CACGTGGGCAGCA	63
1100	1112	13	AGCAAAGTGTGACA	2	1	TGTCACACTTGCT	64
1140	1152	13	TCAGCGGCCGGGA	2	1	TCCCCGCCGCTGA	65
1225	1237	13	CGGCACCCCTCATA	2	1	TATGAGGGTGCCG	66
1226	1238	13	GGCACCCCTCATAG	2	1	CTATGAGGGTGCC	67
1227	1239	13	GCACCCCTCATAGG	2	1	CCTATGAGGGTGCC	68
1229	1241	13	ACCCTCATAGGCC	2	1	GGCCTATGAGGGT	69
1230	1242	13	CCCTCATAGGCCT	2	1	AGGCCTATGAGGG	70
1234	1246	13	CATAGGCCTGGAG	2	1	CTCCAGGCCTATG	71
1244	1256	13	GAGTTTATTCGGA	2	1	TCCGAATAAACTC	72
1388	1400	13	AACTCCGGGACG	2	1	CGTCCCGGAAGTT	73
2929	2941	13	GGCTCCCTGATTA	2	1	TAATCAGGGGAGCC	74
843	855	13	TGAAAGTTGCCCCCA	2	1	TGGGGCAACTTCA	75

845	857	13	AAGTTGCCCCATG	2	1	CATGGGGCAACTT	76
1137	1149	13	TGGTCAGCGCGG	2	2	CGGCCGCTGACCA	77
1138	1150	13	GGTCAGCGGCGG	2	2	CGGCCGCTGACC	78
1243	1255	13	GGAGTTTATTCGG	2	2	CCGAATAAACTCC	79
1581	1593	13	CACAGAGTGGGAC	2	2	GTCCCACTCTGTG	80
1747	1759	13	GACCCCAACCTG	2	2	CAGGTTGGGGTGC	81
2466	2478	13	CCATCTGCTGCCG	2	2	CGGCAGCAGATGG	82
1986	1998	13	GGGGTAGGGTGT	2	3	ACACCCTCACCCC	83
2468	2480	13	ATCTGCTGCCGGA	2	3	TCCGGCAGCAGAT	84
976	988	13	GGTGAGGTGTAT	2	3	ATACACCTCCACC	85
1085	1097	13	TCCACAGACAGG	2	4	CCTGTCTGTGGAA	86
1086	1098	13	TCCACAGACAGGC	2	4	GCCTGTCTGTGGA	87
1245	1257	13	AGTTTATTCGAA	2	4	TTCCGAATAAACT	88
1434	1446	13	AGGTCATCACAGT	2	4	ACTGTGATGACCT	89
1389	1401	13	ACTTCGGGACGA	2	5	TCGTCCCGGAAGT	90
1580	1592	13	TCACAGAGTGGGA	2	6	TCCCACCTGTGTA	91
1240	1252	13	CCTGGAGTTTATT	3	1	AATAAACTCCAGG	92
1410	1422	13	TCTACTCCCCAGC	3	1	GCTGGGGAGTAGA	93
2930	2942	13	GCTCCCTGATTAA	3	1	TTAATCAGGGAGC	94
1082	1095	14	CGCTTCCACAGACA	1	1	TGCTGTGGAAAGCG	95
1084	1097	14	CTTCCACAGACAGG	1	1	CCTGTCTGTGGAAG	96
1100	1113	14	AGCAAGTGTACAG	1	1	CTGTACACTTGCT	97
1136	1149	14	GTGGTCAGCGGCGG	1	1	CGGCCGCTGACAC	98
1138	1151	14	GGTCAGCGGCCGGG	1	1	CCCGCCGCTGACC	99
1139	1152	14	GTCAGCGGCCGGGA	1	1	TCCCGCCGCTGAC	100
1140	1153	14	TCAGCGGCCGGGAT	1	1	ATCCGGCCGCTGA	101
1223	1236	14	AGCGCACCCCTCAT	1	1	ATGAGGGTGCCTGT	102
1224	1237	14	GCGGCACCCCTCATA	1	1	TATGAGGGTGCCTGC	103
1227	1240	14	GCACCCTCATAGGC	1	1	GCCTATGAGGGTGC	104
1228	1241	14	CACCCCTCATAGGCC	1	1	GGCCTATGAGGGTG	105
1230	1243	14	CCCTCATAGGCCTG	1	1	CAGGCCATGAGGGG	106
1231	1244	14	CCTCATAGGCCTGG	1	1	CCAGGCCATGAGG	107
1232	1245	14	CTCATAGGCCTGGA	1	1	TCCAGGCCATGAG	108
1233	1246	14	TCATAGGCCTGGAG	1	1	CTCCAGGCCATGTA	109
1234	1247	14	CATAGGCCTGGAGT	1	1	ACTCCAGGCCATG	110
1235	1248	14	ATAGGCCTGGAGTT	1	1	AACTCCAGGCCAT	111
1236	1249	14	TAGGCCTGGAGTTT	1	1	AACTCCAGGCCATA	112
1237	1250	14	AGGCCTGGAGTTTA	1	1	TAAACTCCAGGCCCT	113
1238	1251	14	GGCCTGGAGTTTAT	1	1	ATAAACTCCAGGCC	114

1239	1252	14	GCCTGGAGTTTATT	1	1	AATAAACTCCAGGC	115
1244	1257	14	GAGTTATTCCGAA	1	1	TTCGAAATAAATC	116
1388	1401	14	AACTCCGGGACGA	1	1	TCGTCCCGGAAGTT	117
1403	1416	14	GCCTGCCTCTACTC	1	1	GAGTAGAGGCAGGC	118
1406	1419	14	TGCCCTACTCCCC	1	1	GGGAGTAGAGGCA	119
1409	1422	14	CTCTACTCCCCAGC	1	1	GCTGGGAGTAGAG	120
1433	1446	14	GAGGTCATCACAGT	1	1	ACTGTGATGACCTC	121
1580	1593	14	TCACAGAGTGGGAC	1	1	GTCCCACTCTGTGA	122
1747	1760	14	GACCCCCAACCTGG	1	1	CCAGGTTGGGGTG	123
1826	1839	14	GCACACTCGGGGCC	1	1	GGCCCCGAGTGTGC	124
1985	1998	14	GGGGGTGAGGGTGT	1	1	ACACCCTCACCCCC	125
1986	1999	14	GGGGTGAGGGTGT	1	1	GACACCCTCACCCC	126
1988	2001	14	GGTGAGGGTGTCTA	1	1	TAGACACCTCACC	127
2237	2250	14	TGCTGCCATGCCCC	1	1	GGGGCATGGCAGCA	128
2465	2478	14	GCCATCTGCTGCCG	1	1	CGGCAGCAGATGGC	129
2466	2479	14	CCATCTGCTGCCGG	1	1	CCGGCAGCAGATGG	130
2469	2482	14	TCTGCTGCCGGAGC	1	1	GCTCCGGCAGCAGA	131
2928	2941	14	GGGCTCCCTGATTA	1	1	TAATCAGGGAGGCC	132
2929	2942	14	GGTCCCTGATTA	1	1	TTAATCAGGGAGGCC	133
843	856	14	TGAAGTTGCCCCAT	1	1	ATGGGGCAACTTCA	134
844	857	14	GAAAGTTGCCCCATG	1	1	CATGGGGCAACTTC	135
976	989	14	GGTGGAGGTGTATC	1	1	GATACACCTCCACC	136
977	990	14	GTGGAGGTGTATCT	1	1	AGATACACCTCCAC	137
978	991	14	TGGAGGTGTATCTC	1	1	GAGATACACCTCCA	138
1083	1096	14	GCTTCCACAGACAG	1	2	CTGTCTGTGGAAGC	139
1085	1098	14	TCCACAGACAGGC	1	2	GCCTGTCTGTGGAA	140
1601	1614	14	GCTGCTGCCACGT	1	2	ACGTGGGAGCAGC	141
1721	1734	14	TGGTCCCTGAGGA	1	2	TCCTCAGGGAAACCA	142
2234	2247	14	TCCTGCTGCCATGC	1	2	GCAATGGCAGCAGGA	143
2468	2481	14	ATCTGCTGCCGGAG	1	2	CTCCGGCAGCAGAT	144
1602	1615	14	CTGCTGCCACCGTG	1	3	CACGTGGCAGCAG	145
1603	1616	14	TGCTGCCACCGTGG	1	3	CCACGTGGGCAGCA	146
1887	1900	14	TGCTGAGCTGCTCC	1	3	GGAGCAGCTCAGCA	147
1886	1899	14	CTGCTGAGCTGCTC	1	4	GAGCAGCTCAGCAG	148
1773	1786	14	CCCCCAGCACCCAT	1	5	ATGGGTGCTGGGGG	149
1137	1150	14	TGGTCAGCGGCCGG	2	1	CCGGCCGCTGACCA	150
1141	1154	14	CAGCGCCGGGATG	2	1	CATCCCGCCCGTG	151
1225	1238	14	CGGCACCTCATAG	2	1	CTATGAGGGTGCCG	152
1226	1239	14	GGCACCTCATAGG	2	1	CCATATGAGGGTGCC	153

1229	1242	14	ACCTCATAGGCCT	2	1	AGGCCTATGAGGT	154
1240	1253	14	CCTGGAGTTATTC	2	1	GAATAAACTCCAG	155
1241	1254	14	CTGGAGTTATTCG	2	1	CGAATAAACTCCAG	156
1243	1256	14	GGAGTTTATTCGA	2	1	TCCGAATAAACTCC	157
1483	1496	14	GGGGACITTTGGGA	2	1	TCCCAAAAGTCCCC	158
1578	1591	14	TGTCACAGAGTGG	2	1	CCCACTCTGTGACA	159
1683	1696	14	TGATCCACTTCTCT	2	1	AGAGAAGTGGATCA	160
1718	1731	14	GCCTGGTTCCCTGA	2	1	TCAGGGAACCCAGGC	161
1748	1761	14	ACCCCAACCTGGT	2	1	ACCAGGTTGGGGT	162
1983	1996	14	TTGGGGGTAGGGT	2	1	ACCTCACCCCAA	163
2086	2099	14	TGTCCACTGCCACC	2	1	GGTGGCAGTGGACA	164
2087	2100	14	GTCCACTGCCACCA	2	1	TGGTGGCAGTGGAC	165
2240	2253	14	TGCCATGCCCCAGG	2	1	CCTGGGCGATGGCA	166
3435	3448	14	CTTTTGTAACTTGA	2	1	TCAAAGTTACAAAAG	167
742	755	14	GGCTGCCCGCCGGG	2	1	CCCGCGGGCAGCC	168
845	858	14	AAGTTGCCCATGT	2	1	ACATGGGCAACTT	169
1205	1218	14	CAAGGGGAGGGCAC	2	2	GTGCCCTCCCTTG	170
1242	1255	14	TGGAGTTTATTCGG	2	2	CGAATAAACTCCA	171
1408	1421	14	CCTTACTCCCCAG	2	2	CTGGGAGTAGAGG	172
1579	1592	14	GTCACAGAGTGGGA	2	2	TCCCACTCTGTGAC	173
1599	1612	14	AGGCTGTGCCAC	2	2	GTGGCAGCAGCCT	174
1682	1695	14	CTGATCCACTTCTC	2	2	GAGAAGTGGATCAG	175
1722	1735	14	GGTTCCCTGAGGAC	2	2	GTCCTCAGGGAACC	176
1746	1759	14	TGACCCCAACCTG	2	2	CAGGTTGGGGTCA	177
1982	1995	14	TTTGGGGTGAGGG	2	2	CCCTACCCCCAAA	178
2235	2248	14	CCTGCTGCCATGCC	2	2	GGCATGGCAGCAGG	179
2238	2251	14	GCTGCCATGCCCA	2	2	TGGGCGATGGCAGC	180
2467	2480	14	CATCTGTGCCGGA	2	2	TCCGGCAGCAGATG	181
3434	3447	14	GCTTTTGTAACTTG	2	2	CAAAGTTACAAAAGC	182
890	903	14	GCCCAGAGCATCCC	2	2	GGGATGCTCTGGGC	183
905	918	14	TGGAACCTGGAGCG	2	2	CGCTCCAGGTTCCA	184
1597	1610	14	ACAGGCTGCTGCC	2	3	GGGCAGCAGCCTGT	185
2233	2246	14	TTCCTGTGCCATG	2	3	CATGGCAGCAGGAA	186
1774	1787	14	CCCCAGCACCCATG	2	7	CATGGGTCTGGGG	187
1142	1155	14	AGCGGCCGGGATGC	3	1	GCATCCCGGCCGT	188
1604	1617	14	GCTGCCACGTTGGC	3	1	GCCACGTGGCAGC	189
1987	2000	14	GGGTGAGGGTGTCT	3	1	AGACACCTCACCC	190
1082	1096	15	CGCTTCCACAGACAG	1	1	CTGTCTGTGGAAGCG	191

1083	1097	15	GCTTCCACAGACAGG	1	1	CCTGTCTGTGGAAGC	192
1084	1098	15	CTTCCACAGACAGGC	1	1	GCCTGICTGTGGAAG	193
1136	1150	15	GTGGTCAGCGGCCGG	1	1	CCGGCCGCTGACCAC	194
1137	1151	15	TGGTCAGCGGCCGGG	1	1	CCGGCCGCTGACCA	195
1138	1152	15	GGTCAGCGGCCGGGA	1	1	TCCCGGCCGCTGACC	196
1139	1153	15	GTCAGCGGCCGGGAT	1	1	ATCCCGGCCGCTGAC	197
1140	1154	15	TCAGCGGCCGGGATG	1	1	CATCCCGGCCGCTGA	198
1223	1237	15	AGCGCACCCCTCATA	1	1	TATGAGGTGCCCGCT	199
1224	1238	15	GCGGCACCCCTCATAG	1	1	CTATGAGGGTGCCCGC	200
1226	1240	15	GGCACCCCTCATAGGC	1	1	GCCTATGAGGGTGCC	201
1227	1241	15	GCACCCCTCATAGGCC	1	1	GGCCTATGAGGGTGC	202
1228	1242	15	CACCCCTCATAGGCCT	1	1	AGGCCCTATGAGGGTG	203
1229	1243	15	ACCCTCATAGGCCCTG	1	1	CAGGCCCTATGAGGGT	204
1230	1244	15	CCCTCATAGGCCCTGG	1	1	CCAGGCCCTATGAGGG	205
1231	1245	15	CCTCATAGGCCCTGGA	1	1	TCCAGGCCCTATGAGG	206
1232	1246	15	CTCATAGGCCCTGGAG	1	1	CTCCAGGCCCTATGAG	207
1233	1247	15	TCATAGGCCCTGGAGT	1	1	ACTCAGGCCCTATGA	208
1234	1248	15	CATAGGCCCTGGAGTT	1	1	AACTCAGGCCCTATG	209
1235	1249	15	ATAGGCCCTGGAGTTT	1	1	AACTCAGGCCCTAT	210
1236	1250	15	TAGGCCCTGGAGTTTA	1	1	TAACTCCAGGCCCTA	211
1237	1251	15	AGGCCCTGGAGTTTAT	1	1	ATAAATCCAGGCCCT	212
1238	1252	15	GGCCTGGAGTTTATT	1	1	AATAAATCCAGGCC	213
1239	1253	15	GCCTGGAGTTTATTC	1	1	GAATAAATCCAGGCC	214
1240	1254	15	CCTGGAGTTTATTCG	1	1	CGAATAAATCCAGG	215
1243	1257	15	GGAGTTTATTCGGAA	1	1	TTCCGAATAAATCC	216
1403	1417	15	GCCTGCCTTACTCC	1	1	GGAGTAGAGGCAGGC	217
1405	1419	15	CTGCCTTACTCCTCC	1	1	GGGGAGTAGAGGCAG	218
1406	1420	15	TGCCCTTACTCCTCCA	1	1	TGGGGAGTAGAGGCA	219
1407	1421	15	GCCTTACTCCTCCAG	1	1	CTGGGGAGTAGAGGC	220
1408	1422	15	CCTTACTCCTCCAGC	1	1	GCTGGGGAGTAGAGG	221
1483	1497	15	GGGGACTTTGGGGAC	1	1	GTCCCAAAGTCCCC	222
1579	1593	15	GTCACAGAGTGGGAC	1	1	GTCCCACTCTGTGAC	223
1603	1617	15	TGCTGCCACCGTGGC	1	1	GCCACGTGGGCAGCA	224
1682	1696	15	CTGATCCACTTCTCT	1	1	AGAGAAGTGGATCAG	225
1718	1732	15	GCCTGGTCCCTGAG	1	1	CTCAGGGAACCCAGGC	226
1721	1735	15	TGGTCCCTGAGGAC	1	1	GTCTCAGGGAACCA	227
1745	1759	15	CTGACCCCAACCTG	1	1	CAGTTGGGGTTCAG	228
1746	1760	15	TGACCCCCAACCTGG	1	1	CCAGGTTGGGGGTCA	229

1747	1761	15	GACCCCAACCTGGT	1	1	ACCAGGTTGGGGTC	230
1772	1786	15	CCCCCAGACCCCAT	1	1	ATGGGTGCTGGGGG	231
1887	1901	15	TGCTGAGCTGCTCCA	1	1	TGGAGCAGCTCAGCA	232
1982	1996	15	TTGGGGGTGAGGGT	1	1	ACCCTACCCCCAAA	233
1983	1997	15	TTGGGGGTGAGGGT	1	1	CACCTCACCCCCAA	234
1984	1998	15	TGGGGGTGAGGGTGT	1	1	ACACCTCACCCCCA	235
1985	1999	15	GGGGTGAGGGTGTCT	1	1	GACACCTCACCCCC	236
1986	2000	15	GGGGTGAGGGTGTCT	1	1	AGACACCTCACCCC	237
1987	2001	15	GGGTGAGGGTGTCTA	1	1	TAGACACCTCACCC	238
2233	2247	15	TTCTGCTGCCATGC	1	1	GCATGGCAGCAGGAA	239
2234	2248	15	TCCTGCTGCCATGCC	1	1	GGCATGGCAGCAGGA	240
2236	2250	15	CTGCTGCCATGCCCC	1	1	GGGGCATGGCAGCAG	241
2237	2251	15	TGCTGCCATGCCCCA	1	1	TGGGGCATGGCAGCA	242
2238	2252	15	GCTGCCATGCCCCAG	1	1	CTGGGGCATGGCAGC	243
2464	2478	15	TGCCATCTGCTGCCG	1	1	CGGCAGCAGATGGCA	244
2465	2479	15	GCCATCTGCTGCCGG	1	1	CCGGCAGCAGATGGC	245
2466	2480	15	CCATCTGCTGCCGGA	1	1	TCCGGCAGCAGATGG	246
2467	2481	15	CATCTGCTGCCGGAG	1	1	CTCCGGCAGCAGATG	247
2468	2482	15	ATCTGCTGCCGGAGC	1	1	GTCCGGCAGCAGAT	248
2469	2483	15	TCTGCTGCCGGAGCC	1	1	GGCTCCGGCAGCAGCA	249
2928	2942	15	GGCTCCCTGATTAA	1	1	TTAATCAGGGAGGCC	250
3434	3448	15	GCTTTTGTAACTTGA	1	1	TCAAGTTACAAAAGC	251
843	857	15	TGAAGTTGCCCCATG	1	1	CATGGGGCAACTTCA	252
844	858	15	GAAGTTGCCCCATGT	1	1	ACATGGGGCAACTTC	253
976	990	15	GGTGGAGGTGTATCT	1	1	AGATACACCTCCACC	254
977	991	15	GTGGAGGTGTATCTC	1	1	GAGATACACCTCCAC	255
1597	1611	15	ACAGGCTGCTGCCCA	1	2	TGGCAGCAGCCTGT	256
1600	1614	15	GGCTGTGCCCCACGT	1	2	ACGTGGCAGCAGCC	257
1601	1615	15	GCTGTGCCCCACGTG	1	2	CACGTGGCAGCAGCC	258
1720	1734	15	CTGGTCCCTGAGGA	1	2	TCCTCAGGGAAACCAG	259
1773	1787	15	CCCCAGCACCCATG	1	2	CATGGGTGCTGGGG	260
1883	1897	15	GAGCTGTGAGCTGC	1	2	GGAGCTCAGCAGCTC	261
1885	1899	15	GCTGTGAGCTGCTC	1	2	GAGCAGCTCAGCAGC	262
1886	1900	15	CTGCTGAGCTGCTCC	1	2	GGAGCAGCTCAGCAG	263
1602	1616	15	CTGTGCCCCACGTGG	1	3	CCACGTGGCAGCAGC	264
1725	1739	15	TCCCTGAGGACCAGC	1	3	GCTGGTCTCAGGGA	265
1771	1785	15	GCCCCCAGCACCCCA	1	3	TGGGTGCTGGGGGGC	266

1120	1134	15	CACCCACCTGGCAGG	2	1	CCTGCCAGGTGGGTG	267
1141	1155	15	CAGCGCCGGGATGC	2	1	GCATCCCGCCGCTG	268
1225	1239	15	CGGACCCTCATAG	2	1	CCTATGAGGTGCCG	269
1241	1255	15	CTGGAGTTTATTCGG	2	1	CCGAATAAACTCCAG	270
1242	1256	15	TGGAGTTTATTCGGA	2	1	TCCGAATAAACTCCA	271
1482	1496	15	TGGGGACTTTGGGGA	2	1	TCCCAAAAGTCCCCA	272
1578	1592	15	TGTCACAGAGTGGGA	2	1	TCCCACTCTGTGACA	273
1595	1609	15	TCACAGGCTGCTGCC	2	1	GGCAGCAGCCTGTGA	274
1599	1613	15	AGGCTGCTGCCCCAG	2	1	CGTGGCAGCAGCCT	275
1717	1731	15	GGCTGGTCCCTGA	2	1	TCAGGGAACCAGGCC	276
1719	1733	15	CCTGGTCCCTGAGG	2	1	CCTCAGGGAACCAGG	277
1748	1762	15	ACCCCAACCTGGTG	2	1	CACCAGGTGGGGT	278
2086	2100	15	TGTCCACTGCCACCA	2	1	TGGTGGCAGTGGACA	279
2232	2246	15	CTTCCTGCTGCCATG	2	1	CATGGCAGCAGGAAG	280
2235	2249	15	CCTGTGCCATGCC	2	1	GGGCATGGCAGCAGG	281
2239	2253	15	CTGCCATGCCCAGG	2	1	CCTGGGCATGGCAG	282
2472	2486	15	GCTGCCGGAGCCGGC	2	1	GCCGGCTCCGGCAGC	283
742	756	15	GGTGCCCCGCCGGGG	2	1	CCCCGGCCGGCAGCC	284
1119	1133	15	GCACCCACCTGGCAG	2	2	CTGCCAGGTGGGTG	285
1596	1610	15	CACAGGCTGCTGCC	2	2	GGGCAGCAGCCTGTG	286
1598	1612	15	CAGGCTGCTGCCAC	2	2	GTGGGCAGCAGCCTG	287
1722	1736	15	GGTCCCTGAGGACC	2	2	GGTCTCAGGGAACC	288
1723	1737	15	GTTCCCTGAGGACCA	2	2	TGGTCTCAGGGAAC	289
1750	1764	15	CCCCAACCTGGTGGC	2	2	GCCACCAGGTGGGG	290
1882	1896	15	GGAGCTGCTGAGCTG	2	2	CAGCTCAGCAGTCC	291
2115	2129	15	TCACAGGCTGCAGCT	2	2	AGCTCAGCCTGTGA	292
2471	2485	15	TGCTGCCGGAGCCGG	2	2	CCGGTCCCGGCAGCA	293
3433	3447	15	TGCTTTTGTAACTTG	2	2	CAAGTTACAAAAGCA	294
1404	1418	15	CCTGCCCTCTACTCCC	2	3	GGGAGTAGAGGCAGG	295
1884	1898	15	AGCTGCTGAGCTGCT	2	3	AGCAGCTCAGCAGCT	296
2231	2245	15	GCITCCTGCTGCCAT	2	3	ATGGCAGCAGGAAGC	297
1118	1132	15	GGCACCCACCTGGCA	3	1	TGCCAGGTGGGTGCC	298
1082	1097	16	CGTTCCACACAGACAGG	1	1	CCTGTCTGTGGAAGCG	299
1083	1098	16	GCTTCCACACACAGGC	1	1	GCCTGTCTGTGGAAGC	300
1136	1151	16	GTGGTCAGCGGCCCGGG	1	1	CCCGCCGCTGACCAC	301
1137	1152	16	TGGTCAGCGGCCCGGGA	1	1	TCCCGCCGCTGACCAC	302
1138	1153	16	GGTCAGCGGCCCGGGAT	1	1	ATCCCGCCGCTGACC	303
1139	1154	16	GTCAGCGGCCCGGGATG	1	1	CATCCCGCCGCTGAC	304

1140	1155	16	TCAGCGGCCGGGATGC	1	1	GCATCCCGGGCCGCTGA	305
1223	1238	16	AGCGGCACCCTCATAG	1	1	CTATGAGGGTGCCGCT	306
1224	1239	16	GGCGACCCTCATAGG	1	1	CCATGAGGGTGCCGC	307
1225	1240	16	CGGCACCCCTCATAGG	1	1	GCCTATGAGGGTGCCG	308
1226	1241	16	GGCACCCCTCATAGGCC	1	1	GGCCATGAGGGTGCC	309
1227	1242	16	GCACCCTCATAGGCTT	1	1	AGGCCTATGAGGGTGC	310
1228	1243	16	CACCCTCATAGGCTTG	1	1	CAGGCCTATGAGGGTG	311
1229	1244	16	ACCCTCATAGGCTGG	1	1	CCAGGCCTATGAGGGT	312
1230	1245	16	CCCTCATAGGCTGGA	1	1	TCCAGGCCTATGAGGG	313
1231	1246	16	CCTCATAGGCTGGAG	1	1	CTCCAGGCCTATGAGG	314
1232	1247	16	CTCATAGGCTGGAGT	1	1	ACTCCAGGCCTATGAG	315
1233	1248	16	TCATAGGCTGGAGTT	1	1	AACTCCAGGCCTATGA	316
1234	1249	16	CATAGGCTGGAGTTT	1	1	AACTCCAGGCCTATG	317
1235	1250	16	ATAGGCTGGAGTTTA	1	1	TAAACTCCAGGCCTAT	318
1236	1251	16	TAGGCTGGAGTTTAT	1	1	ATAAACTCCAGGCCTA	319
1237	1252	16	AGGCTGGAGTTTATT	1	1	AATAAACTCCAGGCCT	320
1238	1253	16	GGCCTGGAGTTTATTC	1	1	GAATAAACTCCAGGC	321
1239	1254	16	GCCTGGAGTTTATTCG	1	1	CGAATAAACTCCAGGC	322
1240	1255	16	CCTGGAGTTTATTCGG	1	1	CCGAATAAACTCCAGG	323
1242	1257	16	TGGAGTTTATTCGGAA	1	1	TTCCGAATAAACTCCA	324
1403	1418	16	GCCTGCCTCTACTCCC	1	1	GGGAGTAGAGGCAGGC	325
1404	1419	16	CCTGCCTCTACTCCCC	1	1	GGGGAGTAGAGGCAGG	326
1405	1420	16	CTGCCCTCTACTCCCCA	1	1	TGGGGAGTAGAGGCAG	327
1406	1421	16	TGCCCTCTACTCCCCAG	1	1	CTGGGGAGTAGAGGCA	328
1407	1422	16	GCCTCTACTCCCCCAGC	1	1	GCTGGGGAGTAGAGGCC	329
1482	1497	16	TGGGGACTTTGGGGAC	1	1	GTCCCCAAAGTCCCCA	330
1578	1593	16	TGTCACAGAGTGGGAC	1	1	GTCCCACTCTGTGACA	331
1595	1610	16	TCACAGGCTGCTGCC	1	1	GGCAGCAGCCTGTGA	332
1596	1611	16	CACAGGCTGCTGCCCA	1	1	TGGCAGCAGCCTGTG	333
1597	1612	16	ACAGGCTGCTGCCAC	1	1	GTGGCAGCAGCCTGT	334
1599	1614	16	AGGCTGCTGCCACGT	1	1	ACGTGGGCAGCAGCCT	335
1602	1617	16	CTGCTGCCACGTGGC	1	1	GCCACGTGGGCAGCAG	336
1717	1732	16	GGCCTGGTCCCTGAG	1	1	CTCAGGGAACCCAGGCC	337
1718	1733	16	GCCTGGTCCCTGAGG	1	1	CCTCAGGGAACCCAGGC	338
1719	1734	16	CCTGGTCCCTGAGGA	1	1	TCCCTCAGGGAACCCAG	339
1720	1735	16	CTGGTCCCTGAGGAC	1	1	GTCCCTCAGGGAACCCAG	340
1721	1736	16	TGGTCCCTGAGGACC	1	1	GGTCCCTCAGGGAACCA	341
1724	1739	16	TTCCCTGAGGACCAGC	1	1	GCTGGTCCCTCAGGGAA	342

1745	1760	16	CTGACCCCAACCTGG	1	1	CCAGGTTGGGGGTCAG	343
1746	1761	16	TGACCCCAACCTGGT	1	1	ACCAGGTTGGGGTCA	344
1747	1762	16	GACCCCAACCTGGTG	1	1	CACCAGTTGGGGTC	345
1748	1763	16	ACCCCAACCTGGTGG	1	1	CCACAGTTGGGGGT	346
1770	1785	16	TGCCCCAGCACCCA	1	1	TGGGTGCTGGGGGCA	347
1771	1786	16	GCCCCAGCACCCAT	1	1	ATGGGTGCTGGGGGC	348
1772	1787	16	CCCCAGCACCCATG	1	1	CATGGGTGCTGGGGG	349
1882	1897	16	GGAGCTGCTGAGCTGC	1	1	GCAGCTCAGCAGCTCC	350
1883	1898	16	GAGCTGCTGAGCTGCT	1	1	AGCAGCTCAGCAGCTC	351
1884	1899	16	AGCTGCTGAGCTGCTC	1	1	GAGCAGCTCAGCAGCT	352
1885	1900	16	GCTGCTGAGCTGCTCC	1	1	GGAGCAGCTCAGCAGC	353
1886	1901	16	CTGCTGAGCTGCTCCA	1	1	TGGAGCAGCTCAGCAG	354
887	1902	16	TGCTGAGCTGCTCCAG	1	1	CTGGAGCAGCTCAGCA	355
1982	1997	16	TTTGGGGGTGAGGGTG	1	1	CACCCTCACCCCAAA	356
1983	1998	16	TTGGGGGTGAGGGTGT	1	1	ACACCTCACCCCAAA	357
1984	1999	16	TGGGGGTGAGGGTGTCT	1	1	GACACCTCACCCCAAA	358
1985	2000	16	GGGGGTGAGGGTGTCT	1	1	AGACACCTCACCCCAAA	359
1986	2001	16	GGGGTGGGGTGTCTTA	1	1	TAGACACCTCACCCCA	360
2231	2246	16	GCTTCTGCTGCCATG	1	1	CATGGCAGCAGGAAGC	361
2232	2247	16	CTTCTGCTGCCATGC	1	1	GCATGGCAGCAGGAAG	362
2233	2248	16	TTCTGCTGCCATGCC	1	1	GGCATGGCAGCAGGA	363
2234	2249	16	TCCTGCTGCCATGCC	1	1	GGCATGGCAGCAGGA	364
2235	2250	16	CCTGCTGCCATGCC	1	1	GGGGCATGGCAGCAGG	365
2236	2251	16	CTGCTGCCATGCCCA	1	1	TGGGGCATGGCAGCAG	366
2237	2252	16	TGCTGCCATGCCCCAG	1	1	CTGGGGCATGGCAGCA	367
2238	2253	16	GCTGCCATGCCCCAGG	1	1	CCTGGGGCATGGCAGC	368
2464	2479	16	TGCCATCTGCTGCCGG	1	1	CCGGCAGCAGATGGCA	369
2465	2480	16	GCCATCTGCTGCCGGA	1	1	TCCGGCAGCAGATGGC	370
2466	2481	16	CCATCTGCTGCCGGAG	1	1	CTCCGGCAGCAGATGG	371
2467	2482	16	CATCTGCTGCCGGAGC	1	1	GCTCCGGCAGCAGATG	372
2468	2483	16	ATCTGCTGCCGGAGCC	1	1	GGCTCCGGCAGCAGAT	373
2469	2484	16	TCTGCTGCCGGAGCCG	1	1	CGGCTCCGGCAGCAGA	374
2471	2486	16	TGCTGCCGGAGCCGGC	1	1	GCCGGCTCCGGCAGCA	375
3432	3447	16	TTGCTTTTGTAACTTG	1	1	CAAGTTACAAAAGCAA	376
3433	3448	16	TGCTTTTGTAACTTGA	1	1	TCAAGTTACAAAAGCA	377
843	858	16	TGAAGTTGCCCCCATGT	1	1	ACATGGGGCAACTTCA	378

976	991	16	GGTGGAGGTGTATCTC	1	1	GAGATACACCTCCACC	379
1600	1615	16	GGCTGCTGCCACCGTG	1	2	CACGTGGCAGCAGCC	380
1601	1616	16	GCTGTGCCACAGTGG	1	2	CCACGTGGCAGCAGC	381
1722	1737	16	GGTCCCTGAGGACCA	1	2	TGGTCCCTCAGGGAACC	382
1118	1133	16	GGCACCCACCTGGCAG	2	1	CTGCCAGGTGGTGCC	383
1119	1134	16	GCACCCACCTGGCAGG	2	1	CCTGCCAGGTGGGTGC	384
1241	1256	16	CTGGAGTTTATTCCGA	2	1	TCCGAATAAACTCCAG	385
1598	1613	16	CAGGCTGCTGCCACCG	2	1	CGTGGCAGCAGCCTG	386
2114	2129	16	CTCACAGGCTGCAGCT	2	1	AGCTGCAGCCTGTGAG	387
2470	2485	16	CTGCTGCCGGAGCCCGG	2	1	CCGGTCCGGCAGCAG	388
1723	1738	16	GTTCCCTGAGGACCAG	2	2	CTGGTCCCTCAGGGAAC	389
1749	1764	16	CCCCAACCTGGTGGC	2	2	GCCACCCAGGTGGGGG	390
1750	1765	16	CCCCAACCTGGTGGCC	2	2	GGCCACCAGGTGGGGG	391
1880	1895	16	GAGGAGCTGCTGAGCT	2	2	AGCTCAGCAGCTCCTC	392
1881	1896	16	AGGAGCTGCTGAGCTG	2	2	CAGCTCAGCAGCTCCT	393

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Santaris A/S
- 5 <120> Compuestos antagonistas de ARN para la modulación de PCSK9
- <130> 1034EP2
- <160> 393
- 10 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 692
- 15 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

```

Met Gly Thr Val Ser Ser Arg Arg Ser Trp Trp Pro Leu Pro Leu Leu
 1                               5                               10                               15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ala Arg Ala Gln Glu
      20                               25                               30

Asp Glu Asp Gly Asp Tyr Glu Glu Leu Val Leu Ala Leu Arg Ser Glu
      35                               40                               45

Glu Asp Gly Leu Ala Glu Ala Pro Glu His Gly Thr Thr Ala Thr Phe
      50                               55                               60

His Arg Cys Ala Lys Asp Pro Trp Arg Leu Pro Gly Thr Tyr Val Val
 65                               70                               75                               80

Val Leu Lys Glu Glu Thr His Leu Ser Gln Ser Glu Arg Thr Ala Arg
      85                               90                               95

Arg Leu Gln Ala Gln Ala Ala Arg Arg Gly Tyr Leu Thr Lys Ile Leu
      100                              105                              110

His Val Phe His Gly Leu Leu Pro Gly Phe Leu Val Lys Met Ser Gly
      115                              120                              125

Asp Leu Leu Glu Leu Ala Leu Lys Leu Pro His Val Asp Tyr Ile Glu
      130                              135                              140

Glu Asp Ser Ser Val Phe Ala Gln Ser Ile Pro Trp Asn Leu Glu Arg
 145                              150                              155                              160

Ile Thr Pro Pro Arg Tyr Arg Ala Asp Glu Tyr Gln Pro Pro Asp Gly

```

ES 2 603 379 T3

					165						170					175
Gly	Ser	Leu	Val	Glu	Val	Tyr	Leu	Leu	Asp	Thr	Ser	Ile	Gln	Ser	Asp	
			180					185					190			
His	Arg	Glu	Ile	Glu	Gly	Arg	Val	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Glu	Asn	Val	
		195					200					205				
Pro	Glu	Glu	Asp	Gly	Thr	Arg	Phe	His	Arg	Gln	Ala	Ser	Lys	Cys	Asp	
	210					215					220					
Ser	His	Gly	Thr	His	Leu	Ala	Gly	Val	Val	Ser	Gly	Arg	Asp	Ala	Gly	
225					230					235					240	
Val	Ala	Lys	Gly	Ala	Ser	Met	Arg	Ser	Leu	Arg	Val	Leu	Asn	Cys	Gln	
				245					250					255		
Gly	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Gly	Thr	Leu	Ile	Gly	Leu	Glu	Phe	Ile	Arg	
			260					265					270			
Lys	Ser	Gln	Leu	Val	Gln	Pro	Val	Gly	Pro	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Pro	
		275					280					285				
Leu	Ala	Gly	Gly	Tyr	Ser	Arg	Val	Leu	Asn	Ala	Ala	Cys	Gln	Arg	Leu	
	290					295					300					
Ala	Arg	Ala	Gly	Val	Val	Leu	Val	Thr	Ala	Ala	Gly	Asn	Phe	Arg	Asp	
305					310					315					320	
Asp	Ala	Cys	Leu	Tyr	Ser	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Glu	Val	Ile	Thr	Val	
				325					330					335		
Gly	Ala	Thr	Asn	Ala	Gln	Asp	Gln	Pro	Val	Thr	Leu	Gly	Thr	Leu	Gly	
			340					345					350			
Thr	Asn	Phe	Gly	Arg	Cys	Val	Asp	Leu	Phe	Ala	Pro	Gly	Glu	Asp	Ile	
		355					360					365				
Ile	Gly	Ala	Ser	Ser	Asp	Cys	Ser	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Gln	Ser	Gly	
	370					375					380					
Thr	Ser	Gln	Ala	Ala	Ala	His	Val	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Met	Met	Leu	
385					390					395					400	
Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Leu	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Ile	

ES 2 603 379 T3

				405						410					415
His	Phe	Ser	Ala	Lys	Asp	Val	Ile	Asn	Glu	Ala	Trp	Phe	Pro	Glu	Asp
			420					425					430		
Gln	Arg	Val	Leu	Thr	Pro	Asn	Leu	Val	Ala	Ala	Leu	Pro	Pro	Ser	Thr
		435					440					445			
His	Gly	Ala	Gly	Trp	Gln	Leu	Phe	Cys	Arg	Thr	Val	Trp	Ser	Ala	His
	450					455					460				
Ser	Gly	Pro	Thr	Arg	Met	Ala	Thr	Ala	Val	Ala	Arg	Cys	Ala	Pro	Asp
465					470					475					480
Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Cys	Ser	Ser	Phe	Ser	Arg	Ser	Gly	Lys	Arg	Arg
				485					490					495	
Gly	Glu	Arg	Met	Glu	Ala	Gln	Gly	Gly	Lys	Leu	Val	Cys	Arg	Ala	His
			500					505					510		
Asn	Ala	Phe	Gly	Gly	Glu	Gly	Val	Tyr	Ala	Ile	Ala	Arg	Cys	Cys	Leu
		515					520					525			
Leu	Pro	Gln	Ala	Asn	Cys	Ser	Val	His	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Glu	Ala
	530					535					540				
Ser	Met	Gly	Thr	Arg	Val	His	Cys	His	Gln	Gln	Gly	His	Val	Leu	Thr
545					550					555					560
Gly	Cys	Ser	Ser	His	Trp	Glu	Val	Glu	Asp	Leu	Gly	Thr	His	Lys	Pro
				565					570					575	
Pro	Val	Leu	Arg	Pro	Arg	Gly	Gln	Pro	Asn	Gln	Cys	Val	Gly	His	Arg
			580					585					590		
Glu	Ala	Ser	Ile	His	Ala	Ser	Cys	Cys	His	Ala	Pro	Gly	Leu	Glu	Cys
		595					600					605			
Lys	Val	Lys	Glu	His	Gly	Ile	Pro	Ala	Pro	Gln	Glu	Gln	Val	Thr	Val
	610					615					620				
Ala	Cys	Glu	Glu	Gly	Trp	Thr	Leu	Thr	Gly	Cys	Ser	Ala	Leu	Pro	Gly
625					630					635					640
Thr	Ser	His	Val	Leu	Gly	Ala	Tyr	Ala	Val	Asp	Asn	Thr	Cys	Val	Val

ES 2 603 379 T3

ctggcgaggg ctggggtcgt gctgggtcacc gctgcccggca acttccggga cgatgcctgc 1260
ctctactccc cagcctcagc tcccgaggtc atcacagttg gggccaccaa tgcccaagac 1320
cagccgggtga ccctggggac tttggggacc aactttggcc gctgtgtgga cctctttgcc 1380
ccaggggagg acatcattgg tgcctccagc gactgcagca cctgctttgt gtcacagagt 1440
gggacatcac aggctgctgc ccacgtggct ggcatgtcag ccatgatgct gtctgccgag 1500
ccggagctca ccctggccga gttgaggcag agactgatcc acttctctgc caaagatgtc 1560
atcaatgagg cctggttccc tgaggaccag cgggtactga cccccaacct ggtggccgcc 1620
ctgcccccca gcacccatgg ggcaggttg cagctgtttt gcaggactgt atggtcagca 1680
cactcggggc ctacacggat ggccacagcc gtcgcccgt ggcccccaga tgaggagctg 1740
ctgagctgct ccagtttctc caggagtggg aagcggcggg gcgagcgcac ggaggcccaa 1800
gggggcaagc tggtctgccg ggcccacaac gcttttgggg gtgagggtgt ctacgccatt 1860
gccaggtgct gcctgctacc ccaggccaac tgcagcgtcc acacagctcc accagctgag 1920
gccagcatgg ggacccgtgt ccactgccac caacagggcc acgtcctcac aggctgcagc 1980
tcccactggg aggtggagga ccttggcacc cacaagccgc ctgtgctgag gccacgaggt 2040
cagcccaacc agtgcggtggg ccacaggag gccagcatcc acgcttctctg ctgccatgcc 2100
ccaggtctgg aatgcaaagt caaggagcat ggaatcccgg cccctcagga gcaggtgacc 2160
gtggcctgcg aggagggctg gaccctgact ggctgcagtg ccctccctgg gacctccac 2220
gtcctggggg cctacgccgt agacaacacg tgtgtagtca ggagccggga cgtcagcaact 2280
acaggcagca ccagcgaagg ggccgtgaca gccgttgeca tctgctgccg gagccggcac 2340
ctggcgcagg cctcccagga gctccagtga cagccccatc ccaggatggg tgtctgggga 2400
gggtcaaggg ctggggtga gctttaaaat ggttccgact tgtccctctc tcagccctcc 2460
atggcctggc acgaggggat ggggatgctt ccgcctttcc ggggctgctg gcctggccct 2520
tgagtggggc agcctccttg cctggaactc actcactctg ggtgcctcct ccccaggtgg 2580
agggtgccag aagctccctc cctcactgtg gggcatttca ccattcaaac aggtcgagct 2640
gtgctcgggt gctgccagct gctcccaatg tgccgatgtc cgtgggcaga atgactttta 2700
ttgagctctt gttccgtgcc aggcattcaa tcctcaggtc tccaccaagg aggcaggatt 2760
cttcccatgg ataggggagg gggcggtagg ggctgcaggg acaaacatcg ttgggggggtg 2820
agtgtgaaag gtgctgatgg ccctcatctc cagctaactg tggagaagcc cctgggggct 2880
ccctgattaa tggaggctta gctttctgga tggcatctag ccagaggctg gagacaggtg 2940
cgccccctgt ggtcacaggc tgtgccttgg tttcctgagc cacctttact ctgctctatg 3000

ES 2 603 379 T3

ccaggctgtg ctagcaacac ccaaaggtgg cctgcgggga gccatcacct aggactgact 3060
 cggcagtgtg cagtgggtgca tgcaactgtct cagccaaccc gctccactac ccggcaggggt 3120
 acacattcgc acccctactt cacagaggaa gaaacctgga accagagggg gcgtgcctgc 3180
 caagctcaca cagcaggaac tgagccagaa acgcagattg ggctggctct gaagccaagc 3240
 ctcttcttac ttcacccggc tgggtctctc atttttacgg gtaacagtga ggctgggaag 3300
 gggaacacag accaggaagc tcggtgagtg atggcagAAC gatgcctgca ggcatggaac 3360
 tttttccggt atcaccagg cctgattcac tggcctggcg gagatgcttc taaggcatgg 3420
 tcgggggaga gggccaacaa ctgtccctcc ttgagcacca gccccacca agcaagcaga 3480
 catttatctt ttgggtctgt cctctctgtt gcctttttac agccaacttt tctagacctg 3540
 ttttgctttt gtaacttgaa gatatttatt ctgggttttg tagcattttt attaatatgg 3600
 tgacttttta aaataaaaac aaacaaacgt tgtcct 3636

5 <210> 3
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Motivo de secuencia preferido

<400> 3
 gcctgtctgt ggaagc 16

15 <210> 4
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Motivo de secuencia preferido

<400> 4
 caagttacaa aagcaa 16

25 <210> 5
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Motivo de secuencia preferido

35 <400> 5
 gagatacacc tccacc 16

40 <210> 6
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Motivo de secuencia preferido

45 <400> 6
 tctcagga accagg 16

5	<210> 7 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de secuencia preferido	
10	<400> 7 ctggagcagc tcagca	16
15	<210> 8 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de secuencia preferido	
20	<400> 8 catggcagca ggaagc	16
25	<210> 9 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Oligómero de LNA	
35	<220> <221> enlace de fosforotioato <222> (1) .. (15)	
40	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (3)	
45	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (15) .. (16)	
50	<400> 9 gagatacacc tccacc	16
55	<210> 10 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Oligómero de LNA	
60	<220> <221> Enlace de fosforotioato <222> (1) .. (15)	
65	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (3)	

	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (2)..(3)	
5	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (14) .. (16)	
10	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (16) .. (16)	
15	<400> 10 gcctgtctgt ggaagc	16
20	<210> 11 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Oligómero de LNA	
30	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (3)	
35	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (1) .. (1)	
40	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (14) .. (16)	
45	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (14)..(14)	
50	<400> 11 caagttacaa aagcaa	16
55	<210> 12 <211> 15 <212> ADN <213> artificial	
60	<220> <223> Oligómero de Control	
65	<220> <221> Enlace de fosforotioato <222> (1) .. (15)	
	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (3)	
	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (1) .. (1)	

	<220>	
	<221> Nucleobase de LNA	
	<222> (13)..(15)	
5	<400> 12	
	cgtcagtatg cgaat 15	
	<210> 13	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Compuesto oligonucleotídico antisentido ISIS	
	<220>	
	<221> Enlace de fosforotioato	
	<222> (1) .. (19)	
20	<220>	
	<221> 2'-O-metil ADN	
	<222> (1) .. (5)	
25	<220>	
	<221> citosina 5'-metil modificada	
	<222> (2)..(3)	
30	<220>	
	<221> citosina 5'-metil modificada	
	<222> (5) .. (5)	
35	<220>	
	<221> citosina 5'-metil modificada	
	<222> (12)..(12)	
40	<220>	
	<221> 2'-O-metil ADN	
	<222> (16)..(20)	
45	<220>	
	<221> citosina 5'-metil modificada	
	<222> (17)..(17)	
50	<220>	
	<221> citosina 5'-metil modificada	
	<222> (19) .. (20)	
	<400> 13	
	gcctcagtct gcttcgacc	20
55	<210> 14	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 14	
	ggtggaggtg tatctc	16
	<210> 15	
	<211> 17	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

	<400> 15 cgcttcaca gacaggc	17
5	<210> 16 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 16 ggcctggttc cctgaggacc agc	23
15	<210> 17 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 17 gaggagctgc tgagctgctc cag	23
25	<210> 18 <211> 23 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 18 gcttcctgct gccatgcccc agg	23
35	<210> 19 <211> 15 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 19 ttgctttgt aactt	15
45	<210> 20 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Oligómero de LNA	
55	<220> <221> Enlace de fosforotioato <222> (1) .. (14)	
60	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (3)	
65	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (12)..(14)	
70	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (14)..(14)	
75	<400> 20 gagtagaggc aggc	14
80	<210> 21 <211> 16 <212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
5	<223> Oligómero de LNA	
	<220>	
	<221> Enlace de fosforotioato	
	<222> (1) .. (15)	
10	<220>	
	<221> Nucleobase de LNA	
	<222> (1) .. (3)	
15	<220>	
	<221> citosina 5'-metil modificada	
	<222> (2)..(3)	
20	<220>	
	<221> Nucleobase de LNA	
	<222> (14) .. (16)	
	<400> 21	
	tcctcagga accagg	16
25	<210> 22	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Oligómero de LNA	
	<220>	
35	<221> Enlace de fosforotioato	
	<222> (1) .. (15)	
	<220>	
40	<221> Nucleobase de LNA	
	<222> (1) .. (3)	
	<220>	
45	<221> citosina 5'-metil modificada	
	<222> (1) .. (1)	
	<220>	
50	<221> Nucleobase de LNA	
	<222> (14) .. (16)	
	<220>	
55	<221> citosina 5'-metil modificada	
	<222> (15)..(15)	
	<400> 22	
	ctggagcagc tcagca	16
60	<210> 23	
	<211> 16	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	
	<223> Oligómero de LNA	
	<220>	
	<221> Enlace de fosforotioato	
	<222> (1) .. (15)	

5	<p><220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (3)</p>	
10	<p><220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (1) .. (1)</p>	
15	<p><220> <221> Nucleobase de LNA <222> (14) .. (16)</p>	
20	<p><220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (16) .. (16)</p>	
25	<p><400> 23 catggcagca ggaagc</p>	16
30	<p><210> 24 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial</p>	
35	<p><220> <223> Oligómero de LNA</p>	
40	<p><220> <221> Enlace de fosforotioato <222> (1) .. (13)</p>	
45	<p><220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (3)</p>	
50	<p><220> <221> Nucleobase de LNA <222> (12)..(14)</p>	
55	<p><220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (13)..(14)</p>	
60	<p><400> 24 gatacacctc cacc</p>	14
65	<p><210> 25 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial</p>	
70	<p><220> <223> Oligómero de LNA</p>	
75	<p><220> <221> Enlace de fosforotioato <222> (1) .. (13)</p>	
80	<p><220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (3)</p>	
85	<p><220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (1) .. (1)</p>	

5	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (12)..(14)	
	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (14)..(14)	
10	<400> 25 ctgtctgtgg aagc	14
15	<210> 26 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Oligómero de LNA	
	<220> <221> Enlace de fosforotioato <222> (1) .. (12)	
25	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (2)	
30	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (11) .. (13)	
35	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (12)..(12)	
	<400> 26 gtctgtggaa gcg	13
40	<210> 27 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Oligómero de LNA	
50	<220> <221> Enlace de fosforotioato <222> (1) .. (12)	
55	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (12)	
	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (11) .. (13)	
60	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (11) .. (11)	
65	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (13)..(13)	

	<400> 27 atgagggtgc cgc	13
5	<210> 28 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Oligómero de LNA	
15	<220> <221> Enlace de fosforotioato <222> (1) .. (12)	
20	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (2)	
25	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (11) .. (13)	
30	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (13)..(13)	
30	<400> 28 ataaactcca ggc	13
35	<210> 29 <211> 13 <212> ADN <213> artificial	
40	<220> <223> Oligómero de LNA	
45	<220> <221> Enlace de fosforotioato <222> (1) .. (12)	
50	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (1) .. (2)	
55	<220> <221> Nucleobase de LNA <222> (11) .. (13)	
60	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (11) .. (11)	
65	<220> <221> citosina 5'-metil modificada <222> (13)..(13)	
60	<400> 29 tagacacct cac	13
65	<210> 30 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	

<220>
 <223> Motivo de oligómero
 5 <400> 30
 gagtagaggc aggc 14
 <210> 31
 <211> 16
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Motivo de oligómero
 15 <400> 31
 tcctcagga accagg 16
 <210> 32
 <211> 16
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Motivo de oligómero
 25 <400> 32
 ctggagcagc tcagca 16
 <210> 33
 <211> 16
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Motivo de oligómero
 35 <400> 33
 catggcagca ggaagc 16
 <210> 34
 <211> 14
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Motivo de oligómero
 45 <400> 34
 gatacacctc cacc 14
 <210> 35
 <211> 14
 50 <212> ADN
 <213> Motivo de oligómero
 <400> 35
 ctgtctgtgg aagc 14
 <210> 36
 <211> 13
 60 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Motivo de oligómero
 65

ES 2 603 379 T3

	<400> 36 gtctgtggaa gcg	13
5	<210> 37 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligómero	
15	<400> 37 atgagggtgc cgc	13
20	<210> 38 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligómero	
25	<400> 38 ataaactcca ggc	13
30	<210> 39 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligómero	
35	<400> 39 tagacaccct cac	13
40	<210> 40 <211> 12 <212> ADN	
	<213> Artificial <220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 40 tctgtggaag cg	12
50	<210> 41 <211> 12 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 41 cctatgaggg tg	12
60	<210> 42 <211> 12 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 42 ccgaataaac tc	12
5	<210> 43 <211> 12 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 43 taaactccag gc	12
20	<210> 44 <211> 12 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 44 cggccgctga cc	12
30	<210> 45 <211> 12 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
35	<400> 45 ccaggcctat ga	12
40	<210> 46 <211> 12 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
50	<400> 46 ggcctatgag gg	12
55	<210> 47 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 47 gtctgtggaa gcg	13
65	<210> 48 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 48 cccggccgct gac	13
5	<210> 49 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 49 atgagggtgc cgc	13
20	<210> 50 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 50 gcctatgagg gtg	13
30	<210> 51 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
35	<400> 51 ccaggcctat gag	13
40	<210> 52 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 52 actccaggcc tat	13
50	<210> 53 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 53 taaactccag gcc	13
60	<210> 54 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 54 ataaactcca ggc	13
5	<210> 55 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 55 gccccgagtg tgc	13
20	<210> 56 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 56 tagacacct cac	13
35	<210> 57 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 57 atggggcaac ttc	13
50	<210> 58 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 58 gagatacacc tcc	13
65	<210> 59 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Motivo de oligo	
75	<400> 59 tccaggccta tga	13
80	<210> 60 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 60 ggccccgagt gtg	13
5	<210> 61 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 61 caggcctatg agg	13
20	<210> 62 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 62 agatacacct cca	13
35	<210> 63 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 63 cacgtgggca gca	13
50	<210> 64 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 64 tgtcacactt gct	13
65	<210> 65 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Motivo de oligo	
75	<400> 65 tcccggccgc tga	13
80	<210> 66 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 66 tatgagggtg ccg	13
5	<210> 67 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 67 ctatgagggt gcc	13
20	<210> 68 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 68 cctatgaggg tgc	13
35	<210> 69 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 69 ggcctatgag ggt	13
50	<210> 70 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 70 aggcctatga ggg	13
65	<210> 71 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Motivo de oligo	
75	<400> 71 ctccaggcct atg	13
80	<210> 72 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 72 tccgaataaa ctc	13
5	<210> 73 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 73 cgtcccggaa gtt	13
20	<210> 74 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 74 taatcagga gcc	13
30	<210> 75 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
35	<400> 75 tggggcaact tca	13
40	<210> 76 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 76 catggggcaa ctt	13
50	<210> 77 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 77 cggccgctga cca	13
60	<210> 78 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 78 ccggccgctg acc	13
5	<210> 79 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 79 ccgaataaac tcc	13
20	<210> 80 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 80 gtcccactct gtg	13
30	<210> 81 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
35	<400> 81 caggttgggg gtc	13
40	<210> 82 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 82 cggcagcaga tgg	13
50	<210> 83 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 83 acaccctcac ccc	13
60	<210> 84 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 84 tccggcagca gat	13
5	<210> 85 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 85 atacacctcc acc	13
20	<210> 86 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 86 cctgtctgtg gaa	13
30	<210> 87 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
35	<400> 87 gcctgtctgt gga	13
40	<210> 88 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
50	<400> 88 ttccgaataa act	13
55	<210> 89 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 89 actgtgatga cct	13
65	<210> 90 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 90 tcgtcccgga agt	13
5	<210> 91 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 91 tcccactctg tga	13
20	<210> 92 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 92 aataaactcc agg	13
35	<210> 93 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 93 gctggggagt aga	13
50	<210> 94 <211> 13 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 94 ttaatcaggg agc	13
65	<210> 95 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Motivo de oligo	
75	<400> 95 tgtctgtgga agcg	14
80	<210> 96 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 96 cctgtctgtg gaag	14
5	<210> 97 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 97 ctgtcacact tgct	14
20	<210> 98 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 98 cggccgctga ccac	14
30	<210> 99 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
35	<400> 99 cccggccgct gacc	14
40	<210> 100 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
50	<400> 100 tccggccgc tgac	14
55	<210> 101 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 101 atccggccg ctga	14
65	<210> 102 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

	<400> 102 atgagggtgc cgct	14
5	<210> 103 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 103 tatgagggtg ccgc	14
15	<210> 104 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 104 gcctatgagg gtgc	14
25	<210> 105 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 105 ggcctatgag ggtg	14
35	<210> 106 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 106 caggcctatg aggg	14
45	<210> 107 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 107 ccaggcctat gagg	14
55	<210> 108 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 108	
65		

ES 2 603 379 T3

	tccaggccta tgag	14
5	<210> 109 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 109 ctccaggcct atga	14
15	<210> 110 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 110 actccaggcc tatg	14
30	<210> 111 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 111 aactccaggc ctat	14
40	<210> 112 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 112 aaactccagg ccta	14
50	<210> 113 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 113 taaactccag gcct	14
60	<210> 114 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 114	

ES 2 603 379 T3

	ataaactcca ggcc	14
5	<210> 115 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 115 aataaactcc aggc	14
15	<210> 116 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 116 ttccgaataa actc	14
30	<210> 117 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 117 tcgtcccgga agtt	14
40	<210> 118 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 118 gagtagaggc aggc	14
50	<210> 119 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 119 ggggagtaga ggca	14
60	<210> 120 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 120	

ES 2 603 379 T3

	gctggggagt agag	14
5	<210> 121 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 121 actgtgatga cctc	14
15	<210> 122 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 122 gtccactct gtga	14
30	<210> 123 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 123 ccaggttggg ggtc	14
40	<210> 124 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 124 ggccccgagt gtgc	14
50	<210> 125 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 125 acaccctcac cccc	14
60	<210> 126 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 126	

ES 2 603 379 T3

	gacaccctca cccc	14
5	<210> 127 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 127 tagacaccct cacc	14
15	<210> 128 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 128 ggggcatggc agca	14
30	<210> 129 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 129 cggcagcaga tggc	14
40	<210> 130 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 130 ccggcagcag atgg	14
50	<210> 131 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 131 gctccggcag caga	14
60	<210> 132 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 132	

ES 2 603 379 T3

	taatcagga gcc	14
5	<210> 133 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 133 ttaatcaggg agcc	14
15	<210> 134 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 134 atggggcaac ttca	14
30	<210> 135 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 135 catggggcaa cttc	14
40	<210> 136 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 136 gatacacctc cacc	14
50	<210> 137 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 137 agatacacct ccac	14
60	<210> 138 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 138	

ES 2 603 379 T3

	gagatacacc tcca	14
5	<210> 139 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 139 ctgtctgtgg aagc	14
15	<210> 140 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 140 gcctgtctgt ggaa	14
30	<210> 141 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 141 acgtgggcag cagc	14
40	<210> 142 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 142 tcctcagga acca	14
50	<210> 143 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 143 gcatggcagc agga	14
60	<210> 144 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 144	

ES 2 603 379 T3

	ctccggcagc agat	14
5	<210> 145 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 145 cacgtgggca gcag	14
15	<210> 146 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 146 ccacgtgggc agca	14
30	<210> 147 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 147 ggagcagctc agca	14
40	<210> 148 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 148 gagcagctca gcag	14
50	<210> 149 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 149 atgggtgctg gggg	14
60	<210> 150 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 150	

ES 2 603 379 T3

	ccggccgctg acca	14
5	<210> 151 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 151 catcccggcc gctg	14
15	<210> 152 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 152 ctatgagggt gccg	14
30	<210> 153 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 153 cctatgaggg tgcc	14
40	<210> 154 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 154 aggcctatga ggggt	14
50	<210> 155 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 155 gaataaactc cagg	14
60	<210> 156 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 156	

ES 2 603 379 T3

	cgaataaact ccag	14
5	<210> 157 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 157 tccgaataaa ctcc	14
15	<210> 158 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 158 tcccaaaagt cccc	14
30	<210> 159 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 159 cccactctgt gaca	14
40	<210> 160 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 160 agagaagtgg atca	14
50	<210> 161 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 161 tcaggaacc aggc	14
60	<210> 162 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 162	

ES 2 603 379 T3

	accaggttg ggt	14
5	<210> 163 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 163 accctcacc ccaa	14
15	<210> 164 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 164 ggtggcagtg gaca	14
30	<210> 165 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 165 tggggcagt ggac	14
40	<210> 166 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 166 cctggggcat ggca	14
50	<210> 167 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 167 tcaagttaca aaag	14
60	<210> 168 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 168	

ES 2 603 379 T3

	cccggcgggc agcc	14
5	<210> 169 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 169 acatggggca actt	14
15	<210> 170 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 170 gtgcccttcc ctgt	14
30	<210> 171 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 171 ccgaataaac tcca	14
40	<210> 172 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 172 ctggggagta gagg	14
50	<210> 173 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 173 tcccactctg tgac	14
60	<210> 174 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 174	

	gtgggcagca gcct	14
5	<210> 175 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 175 gagaagtgga tcag	14
15	<210> 176 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 176 gtcctcaggg aacc	14
30	<210> 177 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 177 caggttgggg gtca	14
40	<210> 178 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 178 ccctcacccc caaa	14
50	<210> 179 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 179 ggcatggcag cagg	14
60	<210> 180 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 180	

ES 2 603 379 T3

	tggggcatgg cagc	14
5	<210> 181 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 181 tccggcagca gatg	14
15	<210> 182 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 182 caagttacaa aagc	14
30	<210> 183 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 183 gggatgctct gggc	14
40	<210> 184 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 184 cgctccaggt tcca	14
50	<210> 185 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 185 gggcagcagc ctgt	14
60	<210> 186 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 186	

ES 2 603 379 T3

	catggcagca ggaa	14
5	<210> 187 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 187 catgggtgct gggg	14
15	<210> 188 <211> 14 <212> ADN	
20	<213> Artificial <220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 188 gcatcccggc cgct	14
30	<210> 189 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 189 gccacgtggg cagc	14
40	<210> 190 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 190 agacaccctc accc	14
50	<210> 191 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 191 ctgtctgtgg aagcg	15
60	<210> 192 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 192	

ES 2 603 379 T3

	cctgtctgtg gaagc	15
5	<210> 193 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 193 gcctgtctgt ggaag	15
15	<210> 194 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 194 ccggccgctg accac	15
30	<210> 195 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 195 cccggccgct gacca	15
40	<210> 196 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 196 tcccggccgc tgacc	15
50	<210> 197 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 197 atcccggccg ctgac	15
60	<210> 198 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 198	

ES 2 603 379 T3

	catcccggcc gctga	15
5	<210> 199 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 199 tatgagggtg ccgct	15
15	<210> 200 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 200 ctatgagggt gccgc	15
30	<210> 201 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
40	<400> 201 gcctatgagg gtgcc	15
45	<210> 202 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
55	<400> 202 ggcctatgag ggtgc	15
60	<210> 203 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 203 aggcctatga ggggtg	15
	<210> 204 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 204	

ES 2 603 379 T3

	caggcctatg aggt	15
5	<210> 205 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 205 ccaggcctat gaggg	15
15	<210> 206 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 206 tccaggccta tgagg	15
25	<210> 207 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 207 ctccaggcct atgag	15
35	<210> 208 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 208 actccaggcc tatga	15
45	<210> 209 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 209 aactccaggc ctatg	15
55	<210> 210 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 210	
65		

ES 2 603 379 T3

	aaactccagg cctat	15
5	<210> 211 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 211 taaactccag gccta	15
15	<210> 212 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 212 ataaactcca ggcct	15
30	<210> 213 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
40	<400> 213 aataaactcc aggcc	15
45	<210> 214 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
55	<400> 214 gaataaactc caggc	15
60	<210> 215 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 215 cgaataaact ccagg	15
	<210> 216 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 216	

ES 2 603 379 T3

	ttccgaataa actcc	15
5	<210> 217 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 217 ggagtagagg caggc	15
15	<210> 218 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 218 ggggagtaga ggcag	15
30	<210> 219 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 219 tggggagtag aggca	15
40	<210> 220 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 220 ctggggagta gaggc	15
50	<210> 221 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 221 gctggggagt agagg	15
60	<210> 222 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 222	

ES 2 603 379 T3

	gtccccaag tccc	15
5	<210> 223 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 223 gtcccactct gtgac	15
15	<210> 224 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 224 gccacgtggg cagca	15
30	<210> 225 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 225 agagaagtgg atcag	15
40	<210> 226 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 226 ctcaggaac caggc	15
50	<210> 227 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 227 gtcctcaggg aacca	15
60	<210> 228 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 228	

ES 2 603 379 T3

	caggttgggg gtcag	15
5	<210> 229 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 229 ccaggttggg ggtca	15
15	<210> 230 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 230 accaggttgg gggtc	15
25	<210> 231 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 231 atgggtgctg ggggg	15
35	<210> 232 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 232 tggagcagct cagca	15
45	<210> 233 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 233 accctcacc ccaaa	15
55	<210> 234 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 234	
65		

ES 2 603 379 T3

	caccctcacc cccaa	15
5	<210> 235 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 235 acaccctcac cccca	15
15	<210> 236 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 236 gacaccctca ccccc	15
25	<210> 237 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 237 agacaccctc acccc	15
35	<210> 238 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 238 tagacaccct caccc	15
50	<210> 239 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 239 gcatggcagc aggaa	15
60	<210> 240 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 240	

	ggcatggcag cagga	15
	<210> 241	
5	<211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
10	<223> Motivo de oligo	
	<400> 241 ggggcatggc agcag	15
15	<210> 242 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Motivo de oligo	
	<400> 242 tggggcatgg cagca	15
25	<210> 243 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
30	<223> Motivo de oligo	
	<400> 243 ctggggcatg gcagc	15
35	<210> 244 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Motivo de oligo	
	<400> 244 cggcagcaga tggca	15
45	<210> 245 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Motivo de oligo	
	<400> 245 ccggcagcag atggc	15
55	<210> 246 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
60	<223> Motivo de oligo	
	<400> 246 ccggcagcag atggc	15
65	<210> 247 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	
70	<223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 246 tccggcagca gatgg	15
5	<210> 247 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 247 ctccggcagc agatg	15
15	<210> 248 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 248 gctccggcag cagat	15
25	<210> 249 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 249 ggctccggca gcaga	15
40	<210> 250 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 250 ttaatcaggg agccc	15
	<210> 251 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 251 tcaagttaca aaagc	15
55	<210> 252 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
65	<210> 251 tcaagttaca aaagc	15
	<210> 252 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 252 catggggcaa cttca	15
5	<210> 253 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 253 acatggggca acttc	15
15	<210> 254 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 254 agatacacct ccacc	15
25	<210> 255 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 255 gagatacacc tccac	15
35	<210> 256 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 256 tgggcagcag cctgt	15
45	<210> 257 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 257 acgtgggcag cagcc	15
55	<210> 258 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 258 acgtgggcag cagcc	15
65	<210> 259 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

	<400> 258 cacgtgggca gcagc	15
5	<210> 259 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 259 tcctcaggga accag	15
15	<210> 260 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 260 catgggtgct ggggg	15
25	<210> 261 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 261 gcagctcagc agctc	15
35	<210> 262 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 262 gagcagctca gcagc	15
45	<210> 263 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 263 ggagcagctc agcag	15
55	<210> 264 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 263 ggagcagctc agcag	15
65	<210> 264 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 264 ccacgtgggc agcag	15
5	<210> 265 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 265 gctggtcctc aggga	15
15	<210> 266 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 266 tgggtgctgg ggggc	15
25	<210> 267 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 267 cctgccaggt gggtg	15
35	<210> 268 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 268 gcatcccggc cgctg	15
45	<210> 269 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 269 cctatgaggg tgccg	15
55	<210> 270 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 269 cctatgaggg tgccg	15
65	<210> 270 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 270 ccgaataaac tccag	15
5	<210> 271 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 271 tccgaataaa ctcca	15
15	<210> 272 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 272 tccccaaagt cccca	15
25	<210> 273 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 273 tcccactctg tgaca	15
40	<210> 274 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 274 ggcagcagcc tgtga	15
	<210> 275 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 275 cgtgggcagc agcct	15
55	<210> 276 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
65	<210> 277 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 276 tcaggaacc aggcc	15
5	<210> 277 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 277 cctcagggaa ccagg	15
15	<210> 278 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 278 caccaggttg ggggt	15
25	<210> 279 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 279 tggtagcagt ggaca	15
35	<210> 280 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 280 catggcagca ggaag	15
45	<210> 281 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 281 gggcatggca gcagg	15
55	<210> 282 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 282 gggcatggca gcagg	15
65	<210> 283 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

	<400> 282 cctggggcat ggcag	15
5	<210> 283 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 283 gccggctccg gcagc	15
15	<210> 284 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 284 ccccggcggg cagcc	15
25	<210> 285 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 285 ctgccaggtg ggtgc	15
40	<210> 286 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 286 gggcagcagc ctgtg	15
	<210> 287 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 287 gtgggcagca gcctg	15
55	<210> 288 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 288 gtgggcagca gcctg	15
65	<210> 289 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 288 ggctctcagg gaacc	15
5	<210> 289 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 289 tggctctcag ggaac	15
15	<210> 290 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 290 gccaccaggt tgggg	15
25	<210> 291 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 291 cagctcagca gctcc	15
35	<210> 292 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 292 agctgcagcc tgtga	15
45	<210> 293 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 293 ccggctccgg cagca	15
55	<210> 294 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 294 ccggctccgg cagca	15
65	<210> 295 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 294 caagttacaa aagca	15
5	<210> 295 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 295 gggagtagag gcagg	15
15	<210> 296 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 296 agcagctcag cagct	15
25	<210> 297 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 297 atggcagcag gaagc	15
35	<210> 298 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 298 tgccaggtgg gtgcc	15
45	<210> 299 <211> 16 <212> ADN	
50	<213> Artificial <220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 299 cctgtctgtg gaagcg	16
55	<210> 300 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
65		

ES 2 603 379 T3

	<400> 300 gcctgtctgt ggaagc	16
5	<210> 301 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 301 cccggccgct gaccac	16
15	<210> 302 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 302 tcccgccgc tgacca	16
25	<210> 303 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 303 atcccgccg ctgacc	16
35	<210> 304 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 304 catccggcc gctgac	16
45	<210> 305 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 305 gcatccggc cgctga	16
55	<210> 306 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 306 gcatccggc cgctga	16
65	<210> 307 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 306 ctatgagggt gccgct	16	
5	<210> 307 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> Motivo de oligo		
	<400> 307 cctatgaggg tgccgc	16	
15	<210> 308 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> Motivo de oligo		
	<400> 308 gcctatgagg gtgccg	16	
25	<210> 309 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> Motivo de oligo		
	<400> 309 ggcctatgag ggtgcc	16	
35	<210> 310 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial		
40	<220> <223> Motivo de oligo		
	<400> 310 aggcctatga gggctg		16
45	<210> 311 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial		
50	<220> <223> Motivo de oligo		
	<400> 311 caggcctatg agggctg	16	
55	<210> 312 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial		
60	<220> <223> Motivo de oligo		
65	<220> <223> Motivo de oligo		

ES 2 603 379 T3

	<400> 312 ccaggcctat gaggg	16
5	<210> 313 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 313 tccaggccta tgaggg	16
15	<210> 314 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 314 ctccaggcct atgagg	16
25	<210> 315 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 315 actccaggcc tatgag	16
40	<210> 316 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 316 aactccaggc ctaga	16
	<210> 317 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 317 aaactccagg cctatg	16
55	<210> 318 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
65	<220> <223> Motivo de oligo	

	<400> 318 taaactccag gcctat	16
5	<210> 319 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 319 ataaactcca ggccta	16
15	<210> 320 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 320 aataaactcc aggct	16
25	<210> 321 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 321 gaataaactc caggcc	16
35	<210> 322 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 322 cgaataaact ccaggc	16
45	<210> 323 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 323 ccgaataaac tccagg	16
55	<210> 324 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 324 ccgaataaac tccagg	16
65	<210> 325 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

	<400> 324 ttccgaataa actcca	16
5	<210> 325 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 325 gggagtagag gcaggc	16
15	<210> 326 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 326 ggggagtaga ggcagg	16
25	<210> 327 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 327 tggggagtag aggcag	16
35	<210> 328 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 328 ctggggagta gaggca	16
45	<210> 329 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 329 gctggggagt agaggc	16
55	<210> 330 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 329 gctggggagt agaggc	16
65	<210> 330 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

	<400> 330 gtccccaag tcccca	16
5	<210> 331 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 331 gtcccactct gtgaca	16
15	<210> 332 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 332 gggcagcagc ctgtga	16
25	<210> 333 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 333 tgggcagcag cctgtg	16
40	<210> 334 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 334 gtgggcagca gcctgt	16
	<210> 335 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 335 acgtgggcag cagcct	16
55	<210> 336 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
65	<210> 336 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 336 gccacgtggg cagcag	16
5	<210> 337 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 337 ctcagggaac caggcc	16
15	<210> 338 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 338 cctcagggaa ccaggc	16
25	<210> 339 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 339 tcctcagggaa accagg	16
35	<210> 340 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 340 gtcctcaggg aaccag	16
45	<210> 341 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 341 ggtcctcaggg gaacca	16
55	<210> 342 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 342 ggtcctcaggg gaacca	16
65	<210> 343 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

	<400> 342 gctggtcctc agggaa	16
5	<210> 343 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 343 ccagggtggg ggtcag	16
15	<210> 344 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 344 accaggttgg gggcca	16
25	<210> 345 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 345 caccaggttg ggggtc	16
35	<210> 346 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 346 ccaccaggtt gggggt	16
45	<210> 347 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 347 tgggtgctgg ggggca	16
55	<210> 348 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 348 tgggtgctgg ggggca	16
65	<210> 349 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 348 atgggtgctg gggggc	16
5	<210> 349 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 349 catgggtgct gggggg	16
15	<210> 350 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 350 gcagctcagc agctcc	16
30	<210> 351 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Motivo de oligo	
35	<400> 351 agcagctcag cagctc	16
40	<210> 352 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 352 gagcagctca gcagct	16
50	<210> 353 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
	<400> 353 ggagcagctc agcagc	16
60	<210> 354 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 354 tggagcagct cagcag	16
5	<210> 355 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 355 ctggagcagc tcagca	16
20	<210> 356 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 356 cacctcacc cccaaa	16
35	<210> 357 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 357 acacctcac ccccaa	16
50	<210> 358 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 358 gacacctca ccccca	16
65	<210> 359 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Motivo de oligo	
75	<400> 359 agacacctc accccc	16
80	<210> 360 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 360 tagacaccct cacccc	16
5	<210> 361 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 361 catggcagca ggaagc	16
20	<210> 362 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 362 gcatggcagc aggaag	16
35	<210> 363 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 363 ggcatggcag caggaa	16
50	<210> 364 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 364 gggcatggca gcagga	16
65	<210> 365 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Motivo de oligo	
75	<400> 365 ggggcatggc agcagg	16
80	<210> 366 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 366 tggggcatgg cagcag	16
5	<210> 367 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 367 ctggggcatg gcagca	16
20	<210> 368 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 368 cctggggcat ggcagc	16
35	<210> 369 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 369 ccggcagcag atggca	16
50	<210> 370 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 370 tccggcagca gatggc	16
65	<210> 371 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Motivo de oligo	
75	<400> 371 ctccggcagc agatgg	16
80	<210> 372 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 372 gctccggcag cagatg	16
5	<210> 373 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 373 ggctccggca gcagat	16
20	<210> 374 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 374 cggctccggc agcaga	16
35	<210> 375 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 375 gccggctccg gcagca	16
50	<210> 376 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 376 caagttacaa aagcaa	16
65	<210> 377 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Motivo de oligo	
75	<400> 377 tcaagttaca aaagca	16
80	<210> 378 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 378 acatggggca acttca	16
5	<210> 379 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 379 gagatacacc tccacc	16
20	<210> 380 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 380 cacgtgggca gcagcc	16
35	<210> 381 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 381 ccacgtgggc agcagc	16
50	<210> 382 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 382 tggctcctcag ggaacc	16
65	<210> 383 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Motivo de oligo	
75	<400> 383 ctgccaggtg ggtgcc	16
80	<210> 384 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Motivo de oligo	

ES 2 603 379 T3

	<400> 384 cctgccaggt gggtag	16
5	<210> 385 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 385 tccgaataaa ctccag	16
20	<210> 386 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Motivo de oligo	
30	<400> 386 cgtgggcagc agcctg	16
35	<210> 387 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Motivo de oligo	
45	<400> 387 agctgcagcc tggag	16
50	<210> 388 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Motivo de oligo	
60	<400> 388 ccggctccgg cagcag	16
65	<210> 389 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
	<220>	

ES 2 603 379 T3

	<223> Motivo de oligo	
5	<400> 390 gccaccaggt tggggg	16
	<210> 391 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Motivo de oligo	
15	<400> 391 ggccaccagg ttgggg	16
	<210> 392 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Motivo de oligo	
25	<400> 392 agctcagcag ctctc	16
	<210> 393 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Motivo de oligo	
35	<400> 393 cagctcagca gctcct	16

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido, capaz de inhibir la expresión de PCSK9 humana, en el que dicho oligonucleótido antisentido es de 10-25 nucleobases de longitud y es complementario de una región correspondiente de SEQ ID NO 2; en el que el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido gapmer de fórmula A-B-C, en el que:
- 5
- A consiste en o comprende 1-6 análogos de nucleótidos, y
 B consiste en o comprende entre 4 y 12 nucleobases de ADN consecutivas, y
 C consiste en o comprende 1-6 análogos de nucleótidos; en el que los análogos de nucleótidos de A y C aumentan la T_m de la doble cadena de oligonucleótido/diana.
- 10
2. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región B comprende 6 - 12 nucleótidos de ADN consecutivos.
- 15
3. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que los análogos de nucleótidos de A y C son unidades de LNA.
4. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 3 en el que las unidades de LNA son unidades de beta-D-oxi LNA.
- 20
5. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 que comprende unidades de LNA de 3 - 8 nucleótidos.
6. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 - 5, en el que las regiones A y C consisten en 3 nucleótidos de LNA y la región B consiste en 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de ADN consecutivos.
- 25
7. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho oligonucleótido antisentido es de 10 - 16 nucleobases de longitud.
- 30
8. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho oligonucleótido antisentido es de 12 - 14 nucleobases de longitud.
9. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que cada grupo de enlace internucleosídico es un grupo fosforotioato.
- 35
10. El oligonucleótido antisentido, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que A (región 5') consiste en 1, 2 o 3 unidades de LNA; B (dominio central) consiste en 6-12 unidades de ADN, y C (región 3') consiste en 1, 2 o 3 unidades de LNA, y en el que cada grupo de enlace internucleosídico es un grupo fosforotioato.
- 40
11. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho oligonucleótido antisentido es de 12 - 14 nucleobases de longitud.
12. Un conjugado que comprende el oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y al menos un resto no nucleotídico o no polinucleotídico unido covalentemente con dicho oligonucleótido antisentido.
- 45
13. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el oligonucleótido antisentido es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 - 11.
- 50
14. El conjugado de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el oligonucleótido antisentido es como se ha definido en la reivindicación 11.
15. Un oligonucleótido antisentido, o conjugado del mismo, capaz de inhibir la expresión de PCSK9 humana, en el que dicho oligonucleótido antisentido es de 10-25 nucleobases de longitud y es complementario de una región correspondiente de SEQ ID NO 2, para su uso como un medicamento, en el que el oligonucleótido antisentido no es un ARNip.
- 55
16. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el oligonucleótido antisentido es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1- 11, o un conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 12-14.
- 60
17. Un oligonucleótido antisentido, o conjugado del mismo, capaz de inhibir la expresión de PCSK9 humana, en el que dicho oligonucleótido antisentido es de 10-25 nucleobases de longitud y es complementario de una región correspondiente de SEQ ID NO 2, para su uso en el tratamiento de hipercolesterolemia o un trastorno relacionado con hipercolesterolemia seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, desequilibrio de colesterol HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia combinada familiar (FCHL), hiperlipidemia adquirida,
- 65

hipercolesterolemia resistente a estatina, enfermedad de las arterias coronarias (CAD) y enfermedad cardiaca coronaria (CHD), y en el que el oligonucleótido antisentido no es un ARNip.

5 18. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el oligonucleótido antisentido es como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1- 11, o un conjugado de acuerdo con las reivindicaciones 12 - 14.

10 19. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en el que el oligonucleótido antisentido es para su uso en el tratamiento de hipercolesterolemia.

20. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en el que el oligonucleótido antisentido es para su uso en el tratamiento de hipercolesterolemia resistente a estatina.

15 21. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en el que el oligonucleótido antisentido es para su uso en el tratamiento de aterosclerosis.

22. El oligonucleótido antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 - 21, en el que el oligonucleótido antisentido es para su uso en combinación con estatinas.

20 23. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido o un conjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 22, y un diluyente, vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

25 24. Uso de un oligonucleótido antisentido, o conjugado del mismo, capaz de inhibir la expresión de PCSK9 humana, en el que dicho oligonucleótido antisentido es de 10- 25 nucleobases de longitud y es complementario de una región correspondiente de SEQ ID NO 2, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de hipercolesterolemia o un trastorno relacionado seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, desequilibrio de colesterol HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia combinada familiar (FCHL), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a estatina, enfermedad de las arterias coronarias (CAD), y enfermedad cardiaca coronaria (CHD), en el que el oligonucleótido antisentido no es un ARNip.

30 25. El uso de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el medicamento es para su uso en combinación con estatinas.

FIGURA 1

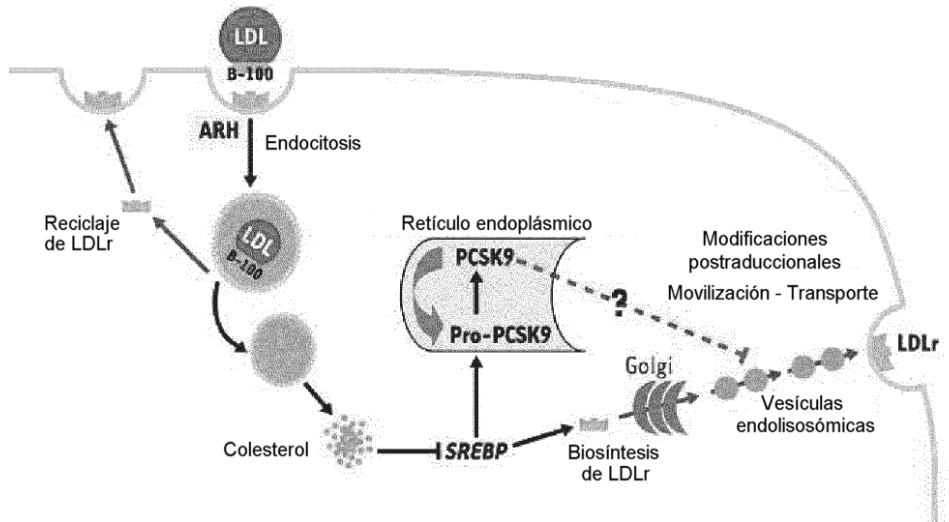


FIGURA 2

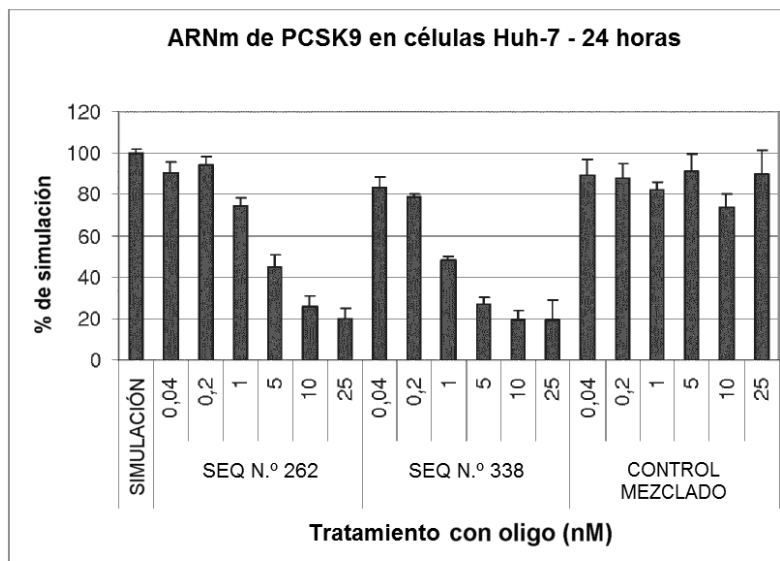


FIGURA 3

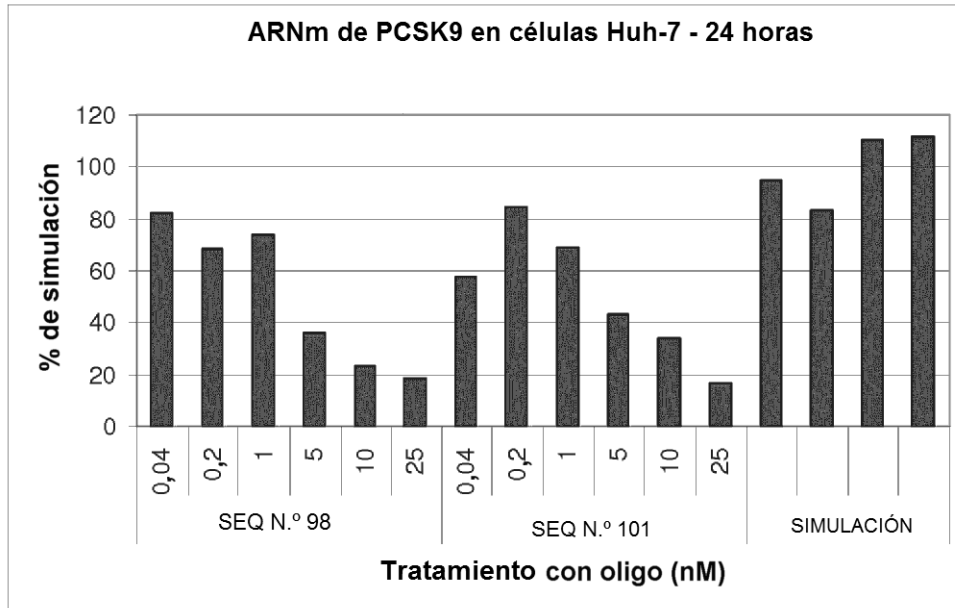


FIGURA 4

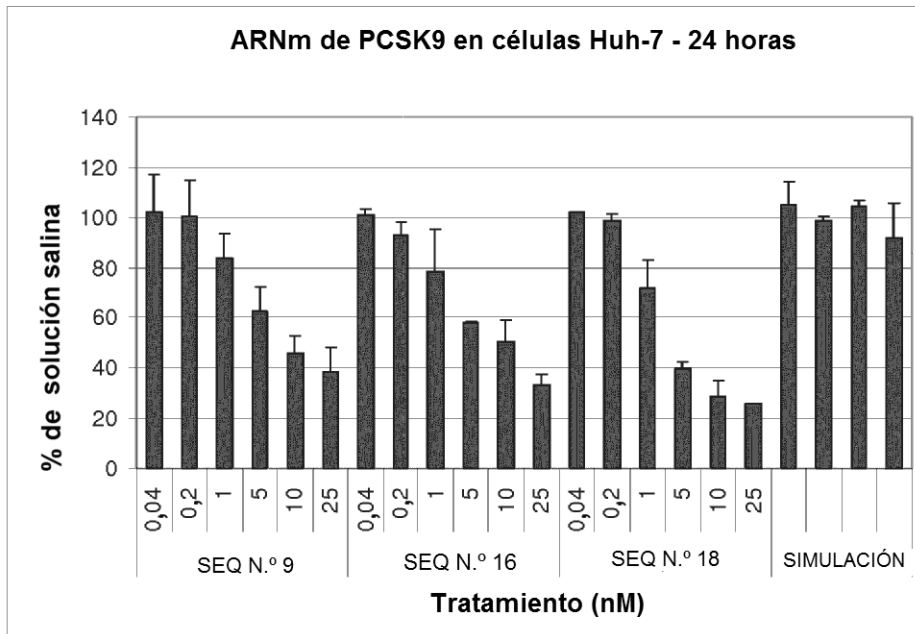


FIGURA 5

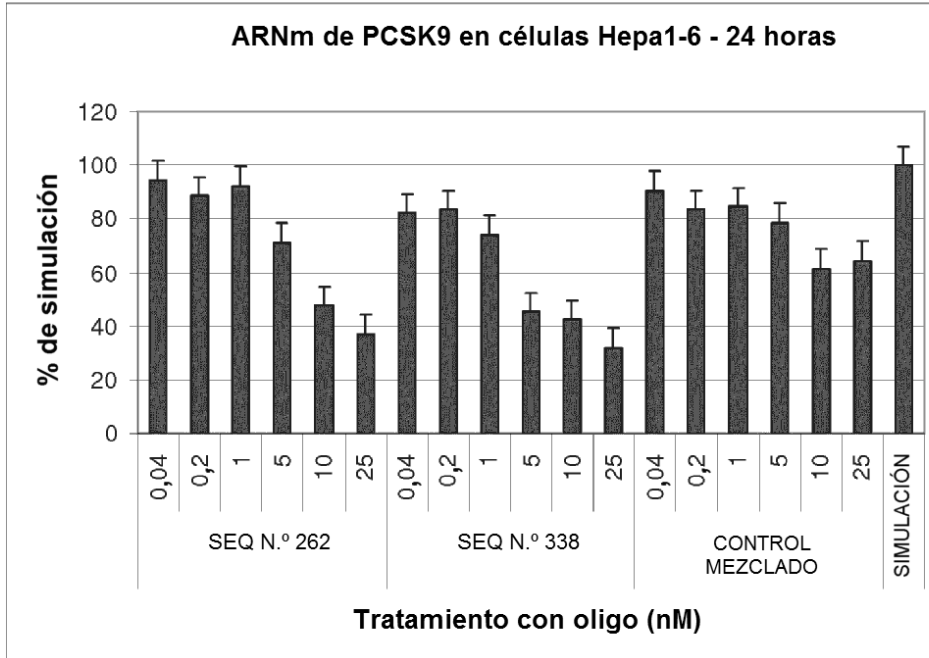


FIGURA 6

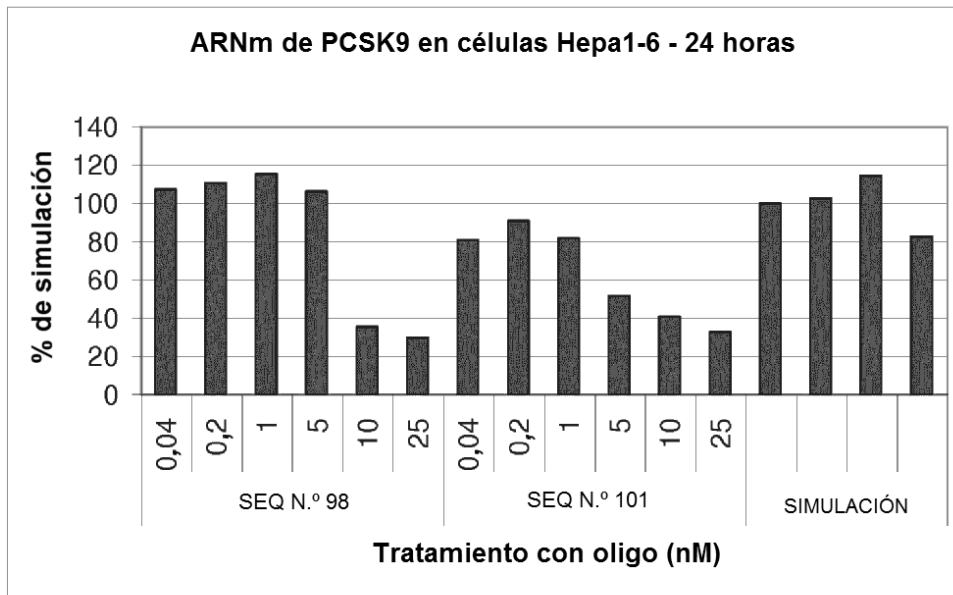


FIGURA 7

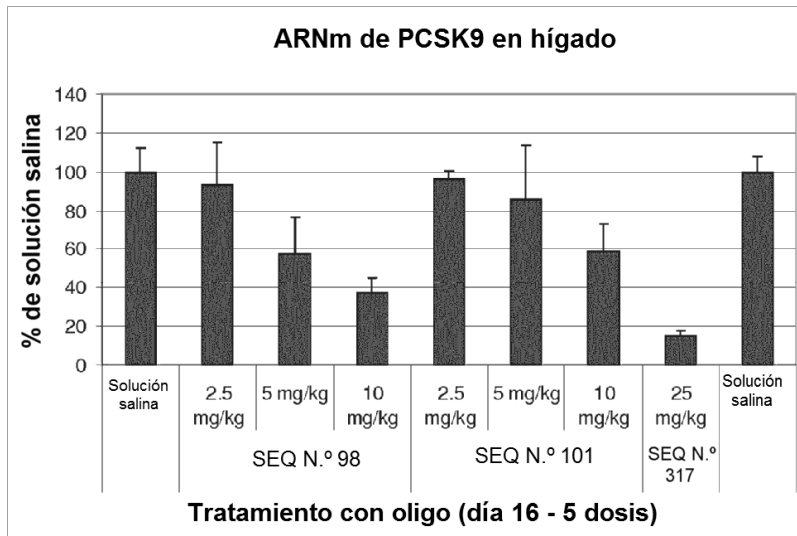


FIGURA 8

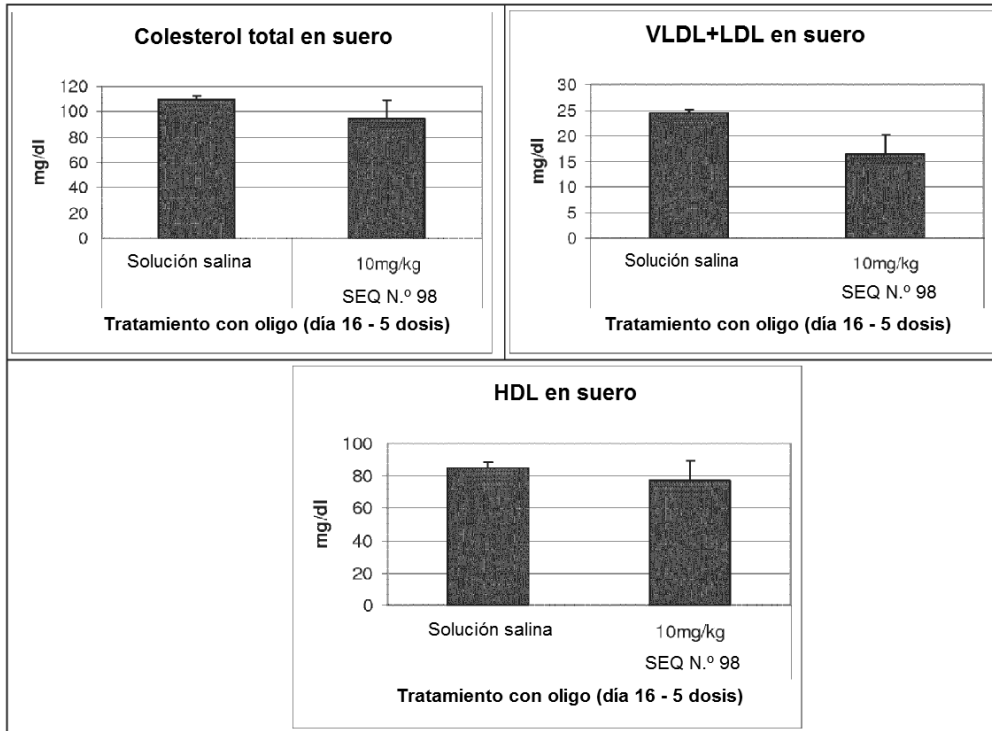


FIGURA 9

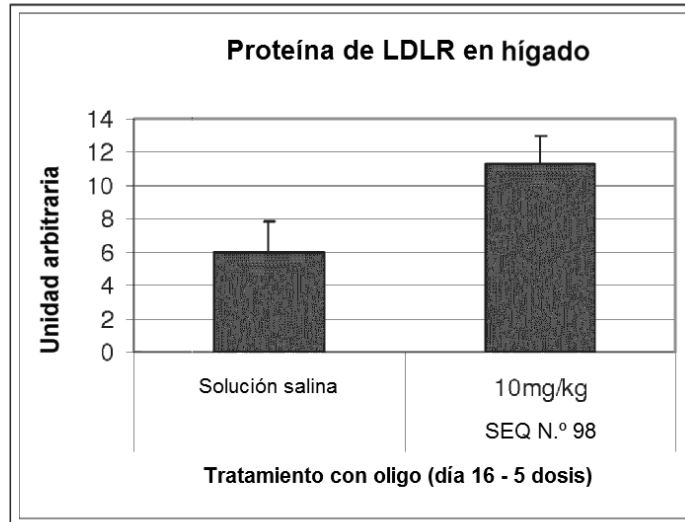


FIGURA 10

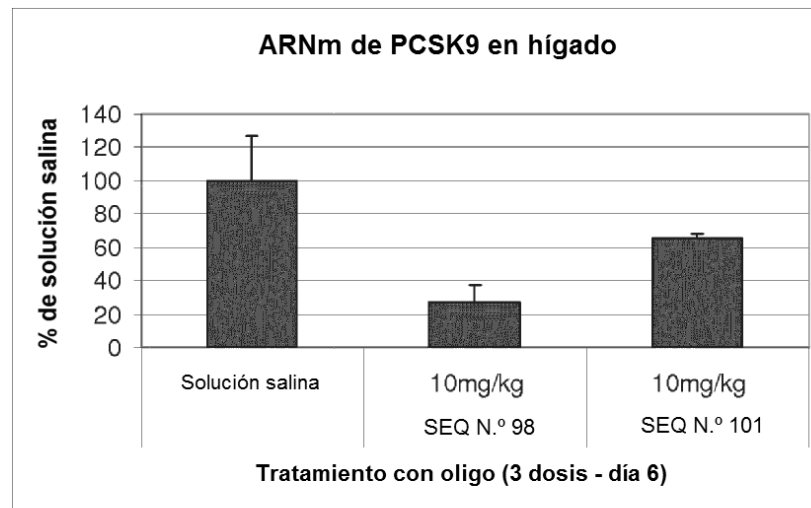


FIGURA 11

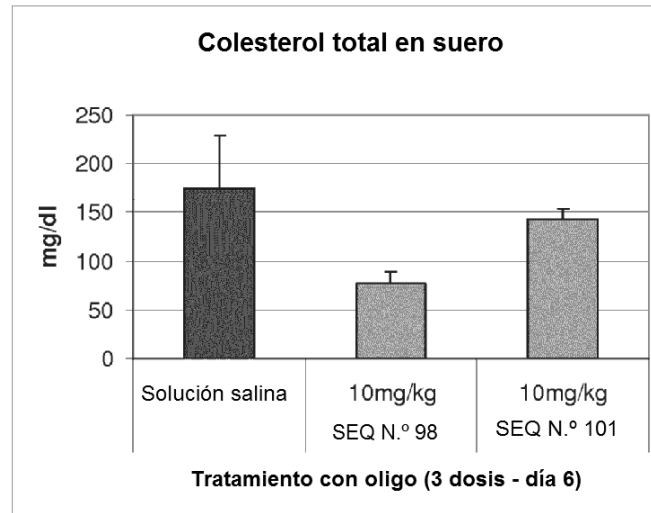


FIGURA 12

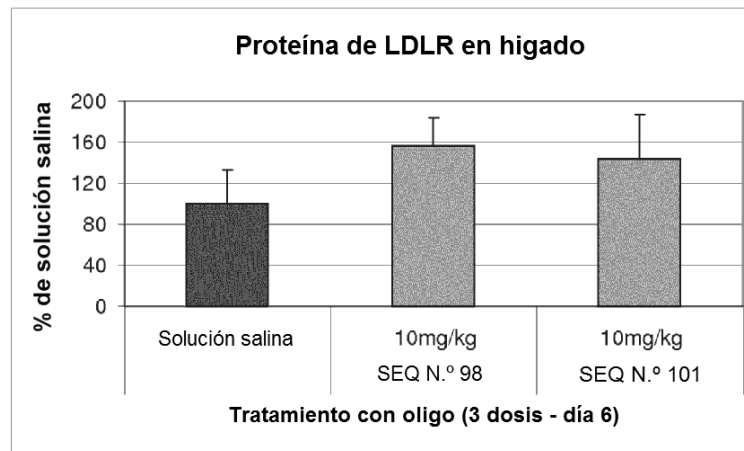


FIGURA 13

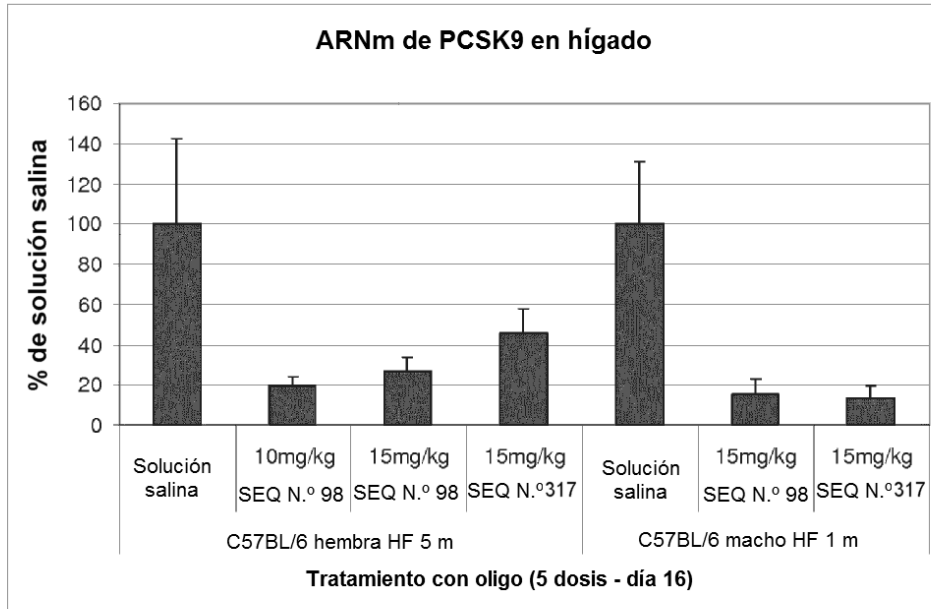


FIGURA 14

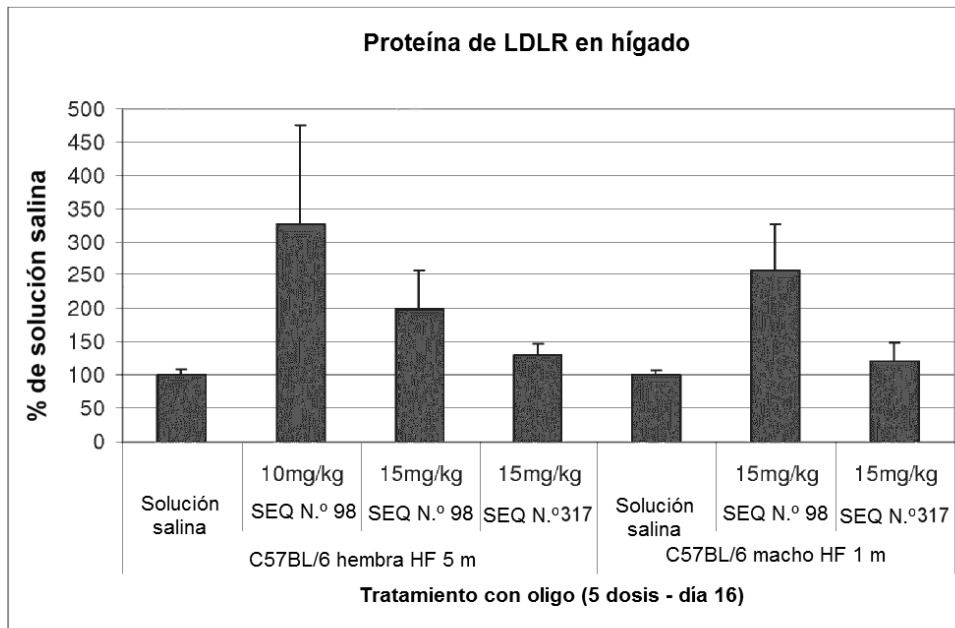


FIGURA 15

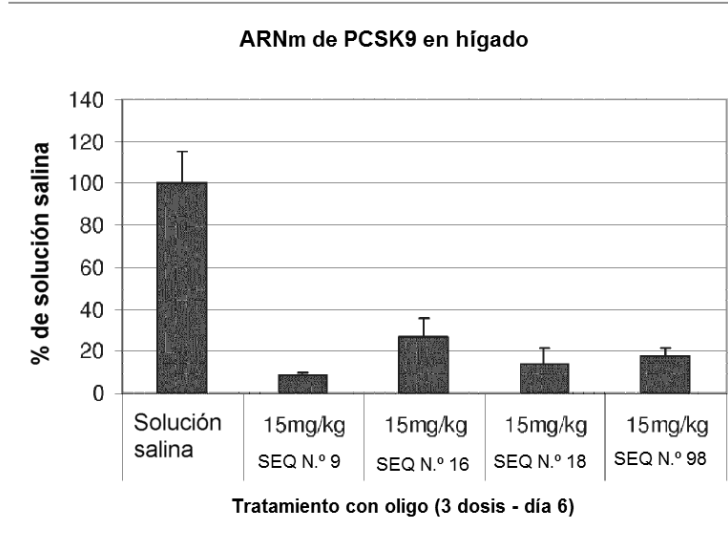


FIGURA 16

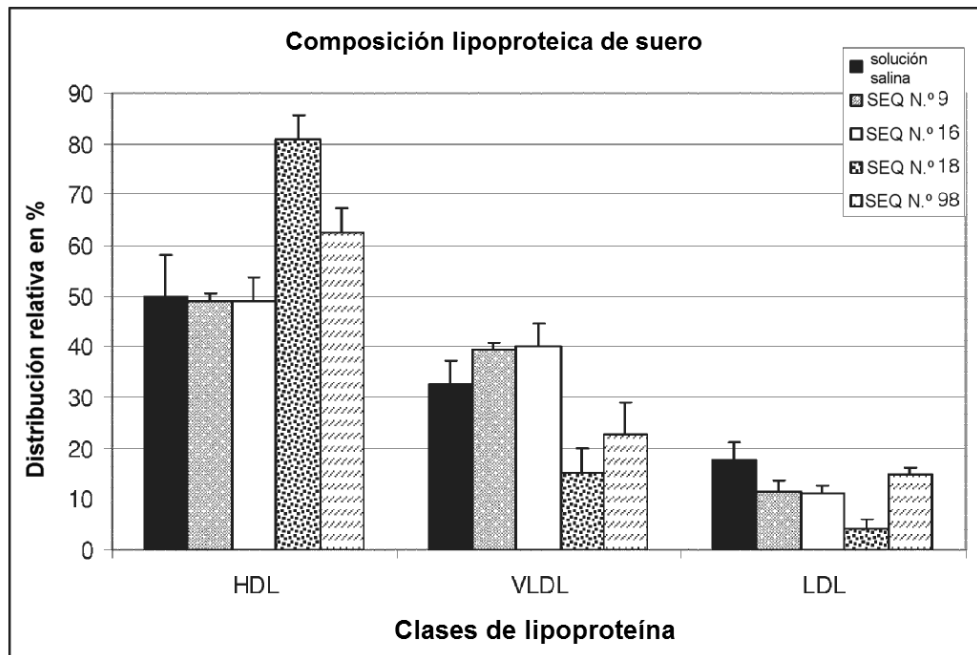


FIGURA 17

```
#####
# Programa: agua
# Fecha de ejecución: viernes 6 de octubre 11:05:47 2006
# Formato de alineamiento: srspair
# Archivo de informe:/ebi/extserv/old-work/water-20061006-11054439127978.output
#####

#=====
#
# Secuencias alineadas: 2
# 1: NM_153565.1
# 2: NM_174936.2
# Matriz: EBLOSUM62
# Penalización de hueco: 10,0
# Penalización de extensión: 0,5
#
# Longitud: 3850
# Identidad: 2557/3850 (66,4%)
# Similitud: 2557/3850 (66,4%)
# Huecos: 547/3850 (14,2%)
# Puntuación: 14522,0
#
#
#=====

NM_153565.1      1 CCACG-CGTCCGGGAGTGGGGATTAAGAGGGGGGAATGTAACAGGTCCCG      49
  |..|| |||| |.|||.||..| |..||| |
NM_174936.2      1 CAGCGACGTC-----GAGGCGCTCATG-----GTTGCAGG---CG      32

NM_153565.1     50 TTGCGAGCCCAATTAGGATTTGGGGTTTGTCTCCTCCTCTGAGCGTCATT      99
  ...|||.|| |..|.||..|| | | | | |
NM_174936.2     33 GGCGCCGCC--GTTTCAGTTCAGGG-----TCTGAGC-----      61

NM_153565.1    100 TGACGCTGTCTGGGGAGGGCGAGGCCG-AAACCTGATCCTTTAGTACCGG      148
  |||. .|||.||.|||||. | .|||...|...|..|||
NM_174936.2     62 -----CTGG-AGGAGTGAGCCAGGCAGTGAGACTGGCTCGGGCGGGCCGG      105

NM_153565.1    149 GGCCCCGTTAATGTTTAAATCAGAGAGGATCTTCCGATGGGGCT-CGGGGTG      197
  |.||| | | | | | | | | | | | | | | |
NM_174936.2    106 GACGCGT-----CGTTGCAGCAGCGG----      126

NM_153565.1    198 GCGTGATCTCCCGCCCCAGGCGTCCAGTA-CCCACACCCAGAAAGGCT      246
  |||||.||.|||| | |||. | .|||.|||
NM_174936.2    127 -----CTCCAGCTCCAG----CCAGGATTCGCGCGCC-----      157

NM_153565.1    247 TCCACCTTCACGTGGACGCGCAGGCTGCCGGTGGGCTCCCGTTCCTCTC      296
  |||| | |||| | | .|||...|...|
NM_174936.2    158 ----CCTTC-----ACGCGC-----CC----TGCTCCTGAACTTCAGC      187

NM_153565.1    297 TCTTTCTGAGGCTAGAGGACTGAGCCAGTCTTGGCTCCCCAGAGACATC      346
  ||..| | | | | | | | | | | | | | |
NM_174936.2    188 TCCTGC-----ACAGTC-----CTCCCC----ACCGC      210

NM_153565.1    347 ACGGCCCGCAGCCCCGGAGCCAAAGTGCCTCCAGGCGTCCATGTC      396
  |.|||||.||..|..||..| | | | | | | | | | | | | |
NM_174936.2    211 AAGGCTCAAGGCGCCGCGGC--GTGGACCGC--CACGGCCTCTAGGTC      256

NM_153565.1    397 -CTTC-CCGAGGCCGCGCGCACCTCTCCTC--GCCCGATGGGCACCCAC      442
  |.|| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
NM_174936.2    257 TCCTCGCCAGGACAGC---AACCTCTCCCTGGCCCTCATGGGCACCGTC      303
```

ES 2 603 379 T3

NM_153565.1	443	TGCTCTGCGTGGCTGCGGTGGCCGCTGTTGCCGCTGTTGCCGCCGCTGCT .	492
NM_174936.2	304	AGCTCCAGGCGGTCTCTGGTGGCCGC-----TGCCACTGCTGCT	341
NM_153565.1	493	GCTGCTGTTGCTGCTACTGTGCCCCACCGCGCTGGTGCCC---AGGACG .	539
NM_174936.2	342	GCTGCTGCTGCTGCTCTCTGGGTCCCGCGGGCGCCCGTGCAGGAGGACG	391
NM_153565.1	540	AGGATGGAGATTATGAAGAGCTGATGCTCGCCCTCCCGTCCCAGGAGGAT .	589
NM_174936.2	392	AGGACGGCGACTACGAGGAGCTGGTGTAGCCTTGCCTCCGAGGAGGAC	441
NM_153565.1	590	GGCCTGGCTGATGAGGCCGACATGTGGCCACCGCCACCTTCCGCCGTTG .	639
NM_174936.2	442	GGCCTGGCCGAAGCACCCGAGCACGGAACCACAGCCACCTTCCACCCTG	491
NM_153565.1	640	CTCCAAGGAGGCCCTGGAGGCTGCCAGGAACCTACATTGTGGTGCTGATGG .	689
NM_174936.2	492	CGCCAAGGATCCGTGGAGGTTGCCCTGGCACCTACGTGGTGGTGCTGAAGG	541
NM_153565.1	690	AGGAGACCCAGAGGCTACAGATTGAACAAACTGCCACCGCCTGCAGACC .	739
NM_174936.2	542	AGGAGACCCACCTCTCGCAGTCAGAGCGCACTGCCCGCCGCTGCAGGCC	591
NM_153565.1	740	CGGGCTGCCCGCCGGGGCTATGTCAATCAAGGTTCTACATATCTTTTATGA .	789
NM_174936.2	592	CAGGCTGCCCGCCGGGATACTCACCAAGATCCTGCATGTCTTCCATGG	641
NM_153565.1	790	CCTCTCCCTGGCTTCTTGGTGAAGATGAGCAGTGACCTGTTGGGCCTGG .	839
NM_174936.2	642	CCTTCTCCTGGCTTCTTGGTGAAGATGAGTGCGACCTGCTGGAGCTGG	691
NM_153565.1	840	CCCTGAAGTTGCCCATGTGGAGTACATTGAGGAAGACTCCTTGTCTTC .	889
NM_174936.2	692	CCTTGAAGTTGCCCATGTGCACTACATCGAGGAGGACTCCTCTGTCTTT	741
NM_153565.1	890	GCCCAGAGCATCCCATGGAACTGGAGCGAATTATCCAGCATGGCACCA .	939
NM_174936.2	742	GCCCAGAGCATCCCGTGGAACTGGAGCGGATTACCCCTCCACGGTACCG	791
NM_153565.1	940	GACAGAGGAAGACCGCTCCCTGATGGAAGCAGCCAGGTGGAGGTGTATC .	989
NM_174936.2	792	GGCGGATGAATACCAGCCCCCGACGGAGGCAGCCTGGTGGAGGTGTATC	841
NM_153565.1	990	TCTTAGATACCAGCATCCAGGGTGCCATCGGGAGATTGAGGGCAGGGTC .	1039
NM_174936.2	842	TCTTAGACACCAGCATAACAGAGTGACCACCGGAAATCGAGGGCAGGGTC	891
NM_153565.1	1040	ACCATCACCGACTTCAACAGCGTGCCGGAGGAGGATGGGACACGCTTCCA .	1089
NM_174936.2	892	ATGGTCACCGACTTCGAGAATGTGCCCGAGGAGGACGGGACCCGCTTCCA	941
NM_153565.1	1090	CAGACAGGCGAGCAAGTGTGACAGCCACGGCACCCACCTGGCAGGTGTGG .	1139
NM_174936.2	942	CAGACAGGCCAGCAAGTGTGACAGTCATGGCACCCACCTGGCAGGGGTGG	991
NM_153565.1	1140	TCAGCGCCGGGATGCTGGTGTGGCCAAGGGCACCAGCCTGCACAGCCTG .	1189
NM_174936.2	992	TCAGCGCCGGGATGCCGGCGTGGCCAAGGGTGCACATGCGCAGCCTG	1041

ES 2 603 379 T3

NM_153565.1	1938	TTGAGGCCATAGGAGGCCAGCAGGTCTGCAAGGCCCTCAATGCATTTGGG	1987
		
NM_174936.2	1790	TGGAGGCCCAAGGGGGCAAGCTGGTCTGCCGGGCCACAACGCTTTTGGG	1839
NM_153565.1	1988	GGTGAGGGTGTCTATGCCGTCGCGAGATGCTGCCTGGTTCCCCGTGCCAA	2037
		
NM_174936.2	1840	GGTGAGGGTGTCTACGCCATTGCCAGGTGCTGCCTGCTACCCAGGCCAA	1889
NM_153565.1	2038	CTGCAGCATCCACAACACCCCTGCAGCCAGAGCTGGCCTGGAGACCCATG	2087
		. .	
NM_174936.2	1890	CTGCAGCGTCCACACAGCTCCACCAGCTGAGGCCAGCATGGGGACCCGTG	1939
NM_153565.1	2088	TCCACTGCCACCAGAAGGACCATGTTCTCACAGGCTGCAGCTTCCATTGG	2137
		. .	
NM_174936.2	1940	TCCACTGCCACCAACAGGGCCACGTCTCACAGGCTGCAGCTCCACTGG	1989
NM_153565.1	2138	GAAGTGAAGACCTTAGTGTCCGGAGGCAGCCTGCGCTGAGGTCCAGACG	2187
		. . .	
NM_174936.2	1990	GAGGTGGAGGACCTTGGCACCACAAGCCGCCTGTGCTGAGGCCACGAGG	2039
NM_153565.1	2188	TCAGCCTGGCCAGTGCCTGGCCACCAGGCGGCCAGTGTCTATGCTTCCT	2237
		
NM_174936.2	2040	TCAGCCAACCAAGTGCCTGGCCACAGGGAGGCCAGCATCCACGCTTCCT	2089
NM_153565.1	2238	GCTGCCATGCCCCAGGGCTGGAATGCAAAATCAAGGAGCATGGGATCTCA	2287
		. .	
NM_174936.2	2090	GCTGCCATGCCCCAGGTCTGGAATGCAAAGTCAAGGAGCATGGAATC-CC	2138
NM_153565.1	2288	GGTCCTTCA-GAGCAGGTCCTGTGGCCTGCGAAGCAGGATGGACCCTGA	2336
		. . .	
NM_174936.2	2139	GGCCCTCAGGAGCAGGTGACCGTGGCCTGCGAGGAGGGCTGGACCCTGA	2188
NM_153565.1	2337	CTGGATGCAATGTGCTCCCTGGGGCATCCCTCACTCTGGGAGCCTACAGC	2386
		. .	
NM_174936.2	2189	CTGGCTGCAGTGCCTCCCTGGGACCTCCACGTCTGGGGCCTACGCC	2238
NM_153565.1	2387	GTGGACAACCTGTGTGTGG-CAAGAGTCCATGAC-ACTGCCAGAGCAGAC	2434
		. .	
NM_174936.2	2239	GTAGACAACACGTGTGTAGTCAAGGAG-CCGGGACGTCAGCACTA-CAGGC	2286
NM_153565.1	2435	AGGACCAGTGGAGAAGCCACAGTAGCTGCTGCCATCTGCTGCCGGAGCCG	2484
		. .	
NM_174936.2	2287	AGCACCAGCGAAGGGGCCGTGACAGCCGTTGCCATCTGCTGCCGGAGCCG	2336
NM_153565.1	2485	GCCTCAGCAAAGGCCTCCTGGG---TTCAGTGACAGCCTCAGGCAGGGA	2531
		. .	
NM_174936.2	2337	GCACCTGGCGCAGGCCTCCAGGAGCTCCAGTGACAGCCCCATCCCAGGA	2386
NM_153565.1	2532	T-GGTGCTT-----AGGCIGGGTGCAGAGAT-----ATG---C	2561
		. .	
NM_174936.2	2387	TGGGTGCTGAGGAGGTCGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT	2435
NM_153565.1	2562	CTGCATGGCTCTCTGTAGCC-----AAAGG-TGGGGA	2593
		. .	
NM_174936.2	2436	CGACTTGTCCCTCTCTAGCCCTCCATGGCCTGGCACGAGGGGATGGGGA	2485
NM_153565.1	2594	-GATTCTGCGT-----GGG-----AGAAGTGTG-TGT-----	2617
		. .	
NM_174936.2	2486	TGCTCCGCCTTTCCGGGGCTGCTGGCCTGGCCCTGAGTGGGGCAGCCT	2535

ES 2 603 379 T3

NM_153565.1	2618	-----TCTCACCTGGGTACC-CATTCC-----TGGTG	2644
		
NM_174936.2	2536	CCTTGCCCTGGAACACTCACTCTGGGTGCCCTCCCCAGGTGGAGGTG	2585
NM_153565.1	2645	TATGGAAGC-ACCTCCTCACGGTCAGGGGGCCTGTGCTTGGCTTCTGTC	2693
		
NM_174936.2	2586	CCAGGAAGCTCCCTCCCTCACTGT---GGGGC-----ATTTCACC	2622
NM_153565.1	2694	CATCAGACA--TTAAGCTGTAGCT--GGCTCTGGCCAGCTGCT-CCAGTG	2738
		
NM_174936.2	2623	ATTCAAACAGGTCGAGCTGT-GCTCGGGTGCT-GCCAGCTGCTCCCAATG	2670
NM_153565.1	2739	TACCAGAACCTGAGG-----ATGCTCGCTGCA	2765
		
NM_174936.2	2671	TGCCGATGTCCGTGGGCAGAATGACTTTTATTGAGCTCTTGTTCCGTGCC	2720
NM_153565.1	2766	AGGCC-TCAGTTCTCAGGCCT----TAGGGTGATTGTCTTTCAGGAA	2809
		
NM_174936.2	2721	AGGCATTCAATCTCAGGTCCTCCACCAAGGAGGCAGGATTCTTCC----	2765
NM_153565.1	2810	GATCAT--AATGGACAGAGATCCTTGGAGGTT-CAAAGACCAAGTACCAG	2856
		
NM_174936.2	2766	---CATGGATAGGGAGGGGGCGGTAGGGGCTGCAGGGACAAA----CAT	2808
NM_153565.1	2857	ACTGGAAAATTGAGTCTGAAAGCCACAAGGACAGTCAACTCACAGCCAGC	2906
		
NM_174936.2	2809	CGTTGGGGGGTGAGTGTGAAAGGTGCT--GATGGCC--CTCATCTCCAGC	2854
NM_153565.1	2907	TCACATTGCAGACACCATTTTGGGCTCCCTGATTAATGCAGATCAG--T	2954
		
NM_174936.2	2855	TAACGTGGAGAAGCCCCTGGGGGCTCCCTGATTAATGGAGGCTTAGCTT	2904
NM_153565.1	2955	TCTGCA---CACCT--CCAGGGG-TGGATCCAG-----CTG-----	2984
		
NM_174936.2	2905	TCTGGATGGCATCTAGCCAGAGGCTGGAGACAGGTGCGCCCCTGGTGGTC	2954
NM_153565.1	2985	TAAGGCCATACCTATATCTTCCAGATGTCTC-----ATCTGC----TGC	3025
		
NM_174936.2	2955	ACAGGCTGTGCCCTGGT-TTCCTGA--GCCACCTTTACTCTGCTCTATGC	3001
NM_153565.1	3026	AGGGCTTTG---GCCCTGCTC-AGGATAATGTGCTATGAGCCCTCA----	3067
		
NM_174936.2	3002	CAGGCTGTGCTAGCAACACCCAAAGGTGGCTGCGGGGAGCCATCACCTA	3051
NM_153565.1	3068	--TCTGACTC-TCAGTTTGTACTGGAGAACCATACAGGACTTACCGCACC	3114
		
NM_174936.2	3052	GGACTGACTCGGCAGTGTGCAGTGGTG---CATGC---AC-TGCTCAGC	3094
NM_153565.1	3115	TTACCCCATCCACTACC-----ATGTGCACTGACTGGCCTC-ATTTTATG	3158
		
NM_174936.2	3095	CAACCCGCTCCACTACCCGGCAGGGTACACATTTCGCACCCCTACTTCACA	3144
NM_153565.1	3159	AAGGAAGAGAC--AGGACCAGAGAGG-----CGATGTCACACAGC	3196
		
NM_174936.2	3145	GAGGAAGAAACCTGGAACCAGAGGGGGCGTGCTGCCAAGCTCACACAGC	3194
NM_153565.1	3197	CAGTGATGTGAGGACATAAATTCAGAGT-GGCTGGCCCTGAA-----	3237
		
NM_174936.2	3195	AGGAACTG--AGCCAGAAACGCAGATTGGGCTGGCTCTGAAGCCAAGCC	3241

ES 2 603 379 T3

```

NM_153565.1      3238 -----TAAT--GCCAGGCTGGGCAGC-----GAGAG      3261
                   ||.| .||.|||||||.|| |.|||
NM_174936.2      3242 TCTTCTTACTTCACCCGGCTGGGCTCCTCATTTTTACGGGTAACAGTGAG      3291

NM_153565.1      3262 G-----ACAG-----GCT-----ATGGCT-----      3275
                   |         |||         ||         |||||.
NM_174936.2      3292 GCTGGGAAGGGGAACACAGACCAGGAAGCTCGGTGAGTGATGCCAGAACG      3341

NM_153565.1      3276 -----TGCT--CCTGGACCTATACTCCCTTAGC-CCCAGTCC-----CAC      3312
                   |||. |.|||||.|||. |.|||.|||. | |||||.|| | |||
NM_174936.2      3342 ATGCCTGCAGGCATGGAACCTTTT-TCCGTTATCACCCAGGCCTGATTAC      3390

NM_153565.1      3313 AGATCAGGTGGAGA-----CT--GGAGTGACAGAGG-----CGA      3345
                   .|.|.|||.|||| | | |.|.|.|.||| |.|
NM_174936.2      3391 TGGCCTGGCGGAGATGCTTCTAAGGCATGGTCGGGGGAGAGGGCCAACAA      3440

NM_153565.1      3346 CTGTACC-----AAG-----GCCACACCAGCTGACCAGCACACCTCTATC      3385
                   |||||.|| | | |.|||| |.|.|.|||||.|||.|||.
NM_174936.2      3441 CTGTCCCTCCTTGAGCACCAGCCCCACC--CAAGCAAGCAGACATTTAT-      3487

NM_153565.1      3386 CTTTTGAG-----CTCTTCTGTCTTTTTATAGTAAGC-TTCCTCCAC      3426
                   |||||.| | |.|.|||.|||||||.|||.|. | |.|||.||
NM_174936.2      3488 CTTTTGGGTCTGTCTCTCTGTTCCTTTTTACAGCCAACCTTTTCTAGAC      3537

NM_153565.1      3427 CTGTGTTGCTTTTGTAACTT---GATATTTATGCAGGGTTTTGTAG--TT      3471
                   |||. ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||
NM_174936.2      3538 CTGTTTIGCTTTTGTAACTTGAAGATATTTATCTGGGTTTTGTAGCATT      3587

NM_153565.1      3472 TTTATT-ATGTAGTGACTTTTCAGAATAAAAAGC-AGCTGATGIGACTGAC      3519
                   ||||| |.|.|||||||.|||.|||.|||. |.|.|.|| | |.|
NM_174936.2      3588 TTTATTAATATGGTGACTTTTTAAAATAAAAACAAACAAACGT---TGTC      3634

```