

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 450**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012** **PCT/US2012/033588**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012** **WO12142458**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012** **E 12771485 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** **EP 2697244**

54 Título: **Modulación antisentido de la expresión de PTP1B**

30 Prioridad:

13.04.2011 US 201161474981 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BHANOT, SANJAY y
FREIER, SUSAN, M.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 634 450 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).

Modulación antisentido de la expresión de PTP1B**Descripción**

5 CAMPO

En la presente memoria se describen métodos, compuestos y composiciones para reducir la expresión de PTP1B mRNA y proteína en un animal. Tales métodos, compuestos y composiciones son útiles, por ejemplo, para tratar, prevenir, retrasar o aliviar enfermedades asociadas con trastornos metabólicos, en particular los trastornos asociados con la diabetes.

FONDO

La proteína de fosfatasa de tirosina 1B (PTP1B) es un miembro de una familia de PTPs (Barford, et al, Science 1994. 263: 1397-1404) y es una enzima citosólica (Neel y Tonks, Curr Opin Cell Biol 1997. 9: 193-204). PTP1B se expresa de forma ubicua incluyendo tejidos que son los principales reguladores del metabolismo de la insulina, como el hígado, músculo y grasa (Goldstein, Receptor 1993. 3: 1-15), donde es la enzima de PTP principal.

PTP1B se considera que es un regulador negativo de la señalización de la insulina. PTP1B interactúa con el receptor de insulina y lo desfosforila, atenuando de este modo y potencialmente terminando la transducción de señalización de la insulina (Goldstein et al, J. Biol Chem 2000, 275: 4383-4389). El papel fisiológico de PTP1B en la señalización de la insulina se ha demostrado en modelos de ratones knockout. Los ratones que carecen del gen PTP1B estaban protegidos contra la resistencia a la insulina y la obesidad (Elchebly et al, Science 1999 283: 1544-1548). Ratones deficientes en PTP1B tenían baja adiposidad, tasa metabólica basal incrementada así como el gasto total de energía, y estaban protegidos de la obesidad inducida por la dieta. La captación de glucosa estimulada por insulina fue elevada en el músculo esquelético, mientras que el tejido adiposo no estaba afectado proporcionando evidencia que la sensibilidad a la insulina incrementada en los ratones deficientes en PTP1B era específica de tejido (Klaman et al, Mol Cell Biol 2000 20: 5479-5489). Estos ratones fueron fenotípicamente normales y también fueron resistentes a la obesidad inducida por la dieta, resistencia a la insulina y tenían significativamente más bajos niveles de triglicéridos en una dieta alta en grasas. Por lo tanto, sería beneficiosa la inhibición de PTP1B en pacientes que sufren de diabetes de tipo II, síndrome metabólico, dislipidemia diabética, o enfermedades metabólicas relacionadas.

Inhibición antisentido de PTP1B ofrece una ventaja única sobre los inhibidores de moléculas pequeñas tradicionales en que los inhibidores antisentido no se basan en la unión competitiva del compuesto a la proteína e inhiben directamente la actividad mediante la reducción de la expresión de PTP1B. La tecnología antisentido está emergiendo como un medio eficaz para reducir la expresión de ciertos productos génicos y por lo tanto puede resultar únicamente útil en un número de aplicaciones de investigación, diagnóstico, y terapéutico para la modulación de PTP1B.

US 2002/055479 describe compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico que codifica PTP1B.

De momento existe una falta de opciones aceptables para el tratamiento de trastornos metabólicos. Es por tanto un objeto para proporcionar compuestos y métodos para el tratamiento de tales enfermedades y trastornos.

45 RESUMEN

En la presente memoria se describen métodos, compuestos y composiciones para modular la expresión de PTP1B y tratar, prevenir, retrasar o aliviar enfermedades asociadas con trastornos metabólicos, en particular los trastornos asociados con la diabetes y/o un síntoma de la misma.

50 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un compuesto que comprende un oligonucleótido monocatenario modificado, en el que dicho oligonucleótido modificado consta de 20 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en SEQ ID NO: 26, en el que el oligonucleótido modificado comprende:

un segmento de hueco que consiste en diez deoxinucleósidos enlazados;

un segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados;

un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados;

en el que el segmento de hueco está colocado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, en el que cada enlace internucleosídico de dicho oligonucleótido modificado es un enlace fosforotioato, y en el que cada residuo de citosina de dicho oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

La invención también proporciona una composición que comprende el compuesto de la invención y al menos uno de un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona el compuesto o composición de la invención para su uso en

a) prevenir, tratar, mejorar, ralentizar la progresión de, o retrasar la aparición de una enfermedad o condición asociada con la PTP1B en un animal; o

b) prevenir o retrasar la aparición de aumento de los niveles de glucosa en sangre en un animal;

c) prevenir, tratar, mejorar, o ralentizar la progresión de una enfermedad metabólica o condición.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Los numerosos objetos y ventajas de la presente invención pueden ser mejor entendidos por los expertos en la técnica haciendo referencia a las figuras adjuntas, en las que:

Figura 1 muestra una transferencia Western de los oligonucleótidos antisentido PTP1B, ISIS 404173 e ISIS 142082, demostrando la disminución de expresión de la proteína PTP1B en 8mgk/semana la potencia de los compuestos. Véase la Tabla 47.

Figura 2 es una tabla de resumen de los estudios de tolerabilidad clave en monos cynomolgus (véase el Ejemplo 17).

Figura 3 es una reducción de representación gráfica de ARNm de PTP1B humano en un estudio preclínico de respuesta a la dosis. El tratamiento con ISIS 404173 se comparó con el de ISIS 113715, el candidato clínico previo. Como se muestra aquí, la dosificación con ISIS 404173 era más potente y causó una reducción significativa en los niveles de PTP1B de ARNm en comparación con la dosificación con ISIS 113715. En particular, en dosis de 0,3 mM, hubo una disminución de cinco veces en los niveles de PTP1B ARNm con ISIS 404173 en comparación con ISIS 113715.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Es de entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención, según se reivindica. En este documento, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Tal como se usa en el presente documento, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, tales como "incluye" y "incluido", no es limitativo. Además, términos tales como "elemento" o "componente" abarcan tanto elementos como componentes que comprenden una unidad y elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Definiciones

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de analítica química, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se pueden utilizar para la síntesis química, y análisis químico.

A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en el presente documento son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica. Las técnicas estándar se pueden utilizar para la síntesis química, y análisis químico. A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

"2'-O-metoxietilo" (también de 2'-MOE y 2'-O (CH₂)₂-OCH₃) Se refiere a una modificación de O-metoxi-etilo de la posición 2' de un anillo furosilo. Un azúcar modificado por 2'-O-metoxietilo es un azúcar modificado.

"Nucleótido de 2'-O-metoxietilo" significa un nucleótido que comprende un resto de azúcar modificado 2'-O-metoxietilo. "Sitio diana 3'" se refiere al nucleótido de una diana de ácido nucleico que es complementaria al extremo de nucleótido más 3' de un compuesto antisentido particular.

"Sitio diana 5'" se refiere al nucleótido de un ácido nucleico diana que es complementario al extremo nucleótido más 5' de un compuesto antisentido particular.

"5-metilcitosina" significa una citosina modificada con un grupo metilo unido a la posición 5'. Una 5-metilcitosina es una nucleobase modificada.

"Aproximadamente" significa dentro de $\pm 10\%$ de un valor. Por ejemplo, si se afirma, "un marcador se puede aumentar en aproximadamente un 50%", se da a entender que el marcador se puede aumentar entre el 45%-55%.

"Agente farmacéutico activo" significa la sustancia o sustancias en una composición farmacéutica que proporciona un beneficio terapéutico cuando se administra a un individuo. Por ejemplo, en ciertas realizaciones un antisentido oligonucleótido dirigido a PTP1B es un agente farmacéutico activo.

"Región diana activa" o "región diana" se refiere a una región a la que uno o más compuestos activos antisentido está dirigido. "Compuestos de antisentido activos" significan compuestos de antisentido que reducen los niveles de ácido nucleico diana o niveles de proteína.

La "adipogénesis" significa el desarrollo de células de grasa de preadipocitos. "Lipogénesis" significa la producción o la formación de grasa, ya sea degeneración grasa o infiltración grasa.

"Adiposidad" o "obesidad" se refiere al estado de ser obeso o una cantidad excesivamente alta de grasa corporal o tejido adiposo en relación con la masa corporal magra. La cantidad de grasa corporal incluye preocupación tanto para la distribución de la grasa en todo el cuerpo como el tamaño y la masa de los depósitos de tejido adiposo. La distribución de grasa corporal se puede estimar mediante medidas de pliegues cutáneos, relaciones de circunferencia de cintura a cadera, o técnicas tales como ultrasonido, tomografía computarizada o resonancia magnética. Según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, los individuos con un índice de masa corporal (IMC) de 30 o más se consideran obesos. El término "obesidad" como se usa en este documento incluye condiciones en las que se produce un aumento en la grasa corporal más allá del requisito físico como resultado de la acumulación excesiva de tejido adiposo en el cuerpo. El término "obesidad" incluye, pero no se limita a las siguientes condiciones: la obesidad de inicio en adultos; obesidad alimentaria; obesidad endógena o inflamatoria; obesidad endocrina; obesidad familiar; obesidad hiperinsulinar; obesidad hiperplásica-hipertrofica; obesidad de hipogonadismo; obesidad de hipotiroidismo; obesidad de toda la vida; obesidad mórbida y la obesidad exógena.

"Administrado concomitantemente" se refiere a la co-administración de dos agentes de cualquier manera en la que los efectos farmacológicos de ambos son manifiestos en el paciente al mismo tiempo. La administración concomitante no requiere que ambos agentes se administren en una sola composición farmacéutica, en la misma forma de dosificación, o por la misma vía de administración. Los efectos de ambos agentes no tienen por qué manifestarse al mismo tiempo. Los efectos sólo necesitan superponerse por un período de tiempo y no necesitan ser coextensivos.

"Administrar" significa proporcionar un agente a un animal, e incluye, pero no se limita a, la administración por un profesional médico y la auto-administración.

"Agente" significa una sustancia activa que puede proporcionar un beneficio terapéutico cuando se administra a un animal. "Primer agente" significa un compuesto terapéutico proporcionado en este documento. Por ejemplo, un primer agente puede ser un PTP1B que se orienta a oligonucleótido antisentido. "Segundo agente" significa un segundo compuesto terapéutico de la invención (por ejemplo, un segundo PTP1B orientado a oligonucleótido antisentido) y/o un compuesto terapéutico no PTP1B.

"Amelioration" se refiere a una disminución de al menos un indicador, muestra, o síntoma de una enfermedad, trastorno o afección asociada. La gravedad de los indicadores se puede determinar mediante medidas subjetivas u objetivas, que son conocidas para los expertos en la técnica.

"Animal" se refiere a un ser humano o animal no humano, incluyendo, pero no limitado a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y primates no humanos, incluyendo, pero no limitado a, monos y chimpancés.

"Actividad antisentido" significa cualquier actividad detectable o medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido a su ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la actividad antisentido es una disminución en la cantidad o expresión de un ácido nucleico diana o la proteína codificada por tal ácido nucleico diana.

"Compuesto antisentido" se refiere a un compuesto oligomérico que es capaz de experimentar la hibridación con un ácido nucleico diana a través de puentes de hidrógeno.

"Inhibición antisentido" se refiere a la reducción de los niveles de ácido nucleico diana o los niveles de proteína diana en presencia de un compuesto antisentido complementario a un ácido nucleico diana en comparación con los niveles diana de ácido nucleico o los niveles de proteína diana en ausencia del compuesto antisentido.

"Oligonucleótido antisentido" significa un oligonucleótido de una sola hebra que tiene una secuencia de nucleobases que permite la hibridación con una región correspondiente o segmento de un ácido nucleico diana.

"Azúcar bicíclico" significa un anillo furosilo modificado por el puente de dos átomos del anillo no geminales. Un azúcar bicíclico es un azúcar modificado.

"Ácido nucleico bicíclico" o "BNA" se refiere a un nucleósido o nucleótido en el que la porción furanosa del nucleósido o nucleótido incluye un puente que conecta dos átomos de carbono en el anillo de furanosa, formando de este modo un sistema de anillo bicíclico.

5 "Estructura de tapa" o "resto de tapa terminal" significa modificaciones químicas, que se han incorporado en cualquier extremo de un compuesto antisentido.

10 "Región químicamente distinta" se refiere a una región de un compuesto antisentido que es de alguna forma químicamente diferente de otra región del mismo compuesto antisentido. Por ejemplo, una región que tiene nucleótidos de 2'-O-metoxietilo es químicamente distinta de una región que tiene los nucleótidos sin modificaciones de 2'-O-metoxietilo.

15 "Compuesto antisentido quimérico" se refiere a un compuesto antisentido que tiene al menos dos regiones químicamente distintas.

20 "Co-administración" significa la administración de dos o más agentes a un individuo. Los dos o más agentes pueden estar en una única composición farmacéutica, o puede estar en composiciones farmacéuticas separadas. Cada uno de los dos o más agentes se pueden administrar a través de las mismas o diferentes vías de administración. Co-administración abarca administración paralela o secuencial.

25 "Colesterol" es una molécula de esteroles que se encuentra en las membranas celulares de todos los tejidos animales. El colesterol debe ser transportado en el plasma sanguíneo de un animal por las lipoproteínas, incluyendo lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), y lipoproteína de alta densidad (HDL). "Colesterol de plasma" se refiere a la suma de todas las lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL, HDL) esterificadas y/o colesterol presente en el plasma o suero no esterificado.

"Inhibidor de la absorción de colesterol" significa un agente que inhibe la absorción del colesterol exógeno obtenido a partir de la dieta.

30 "Complementariedad" significa la capacidad para el apareamiento entre nucleobases de un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico.

"Nucleobases contiguas" significan nucleobases inmediatamente adyacentes la una a la otra.

35 "Desoxirribonucleótido" quiere decir un nucleótido que tiene un hidrógeno en la posición de la porción de azúcar del nucleótido 2'. Los desoxirribonucleótidos pueden ser modificados con cualquiera de una variedad de sustituyentes.

40 "Diabetes mellitus" o "diabetes" es un síndrome caracterizado por el metabolismo desordenado y anormalmente alto de azúcar en sangre (hiperglucemia) como resultado de niveles insuficientes de insulina o sensibilidad reducida a la insulina. Los síntomas característicos son la producción de orina excesiva (poliuria) debido a los niveles de glucosa en sangre, sed excesiva y el aumento de la ingesta de líquidos (polidipsia) procurando compensar la orina incrementada, visión borrosa debido a los efectos de glucosa en sangre en la óptica del ojo, pérdida de peso inexplicada, y letargo.

45 "Dislipidemia diabética" o "diabetes de tipo 2 con dislipidemia" se refiere a una afección caracterizada por diabetes de tipo 2, la reducción de HDL-C, niveles elevados de triglicéridos, y partículas de LDL elevadas pequeñas y densas.

50 "Diluyente" significa un ingrediente en una composición que carece de actividad farmacológica, pero es farmacéuticamente necesario o deseable. Por ejemplo, el diluyente en una composición inyectada puede ser una solución salina líquida, por ejemplo.

55 "Dislipidemia" se refiere a un trastorno de los lípidos y/o metabolismo de las lipoproteínas, incluyendo lípidos y/o lipoproteína de producción excesiva o deficiencia. Las dislipidemias pueden manifestarse por la elevación de los lípidos tales como colesterol y triglicéridos, así como las lipoproteínas tales como las lipoproteínas de baja densidad (LDL).

60 "Unidad de dosificación" significa una forma en la que se proporciona un agente farmacéutico, por ejemplo píldora, comprimido, u otra unidad de dosificación conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación es un vial que contiene oligonucleótido antisentido liofilizado. En ciertas realizaciones, una unidad de dosificación es un vial que contiene oligonucleótido antisentido reconstituido.

65 "Dosis" significa una cantidad especificada de un agente farmacéutico proporcionado en una única administración, o en un período de tiempo especificado. En ciertas realizaciones, una dosis se puede administrar en uno, dos o más bolos, comprimidos o inyecciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones donde se desea la

administración subcutánea, la dosis deseada requiere un volumen que no se acomoda fácilmente mediante una única inyección, por lo tanto, dos o más inyecciones se pueden utilizar para conseguir la dosis deseada. En ciertas realizaciones, el agente farmacéutico se administra por infusión durante un período prolongado de tiempo o de forma continua. Las dosis se pueden afirmar como la cantidad de agente farmacéutico por hora, día, semana o mes.

"Cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad de agente farmacéutico activo suficiente para efectuar un resultado fisiológico deseado en un individuo en necesidad del agente. La cantidad eficaz puede variar entre los individuos, dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico de los individuos a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la condición médica del individuo, y otros factores relevantes.

"Totalmente complementario" o "100% complementario" significa cada nucleobase de una secuencia de nucleobase de un primer ácido nucleico tiene una nucleobase complementaria de una segunda secuencia de nucleobase de un segundo ácido nucleico. En ciertas realizaciones, un primer ácido nucleico es un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana es un segundo ácido nucleico.

"Gápmero" significa un compuesto antisentido quimérico en el que se coloca una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que apoyan la escisión H de RNasa entre las regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en el que los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprende las regiones externas. La región interna puede ser denominada como un "segmento de hueco" y las regiones externas pueden denominarse "segmentos de ala."

"Ensanchado por hueco" significa un compuesto antisentido quimérico que tiene un segmento de hueco de 12 o más 2'-desoxirribonucleósidos contiguos posicionados entre e inmediatamente adyacentes a segmentos de ala 5' y 3' que tienen de uno a seis nucleósidos.

"Glucosa" es un monosacárido utilizado por las células como fuente de energía y el intermedio inflamatorio. "La glucosa en plasma" se refiere a la glucosa presente en el plasma.

"Inhibidor de HMG-CoA" significa un agente que actúa a través de la inhibición de la reductasa de enzima HMG-CoA, tales como atorvastatina, rosuvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina y simvastatina.

"Hibridación" significa la hibridación de moléculas de ácido nucleico complementarias. En ciertas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico complementarias incluyen un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana.

"Hiperlipidemia" o "hiperlipemia" es una condición caracterizada por lípidos séricos elevados o que circulan lípidos (plasma). Esta condición manifiesta una concentración anormalmente alta de grasas. Las fracciones de lípidos en la sangre circulante son colesterol, lipoproteínas de baja densidad, lipoproteínas de muy baja densidad y los triglicéridos.

"Hipertrigliceridemia" se refiere a una afección caracterizada por niveles elevados de triglicéridos.

"Identificación" o "selección de un animal con metabólico" significa identificar o seleccionar un sujeto después de haber sido diagnosticado con una enfermedad metabólica, o un trastorno metabólico; o, identificar o seleccionar un sujeto que tiene cualquier síntoma de una enfermedad metabólica, incluyendo, pero no limitado al síndrome metabólico, hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, resistencia incrementada a la insulina, disminución de la sensibilidad a la insulina, por encima del peso corporal normal, y/o por encima de la grasa corporal normal o cualquier combinación de los mismos. Dicha identificación se puede realizar por cualquier método, incluyendo, pero no limitado a, pruebas o evaluaciones clínicas estándar, tales como la medición de suero o de circulación (plasma) de glucosa en sangre, la medición de suero o triglicéridos circulantes (plasma), la medición de la presión sanguínea, el cuerpo de medición de grasa, la medición de peso corporal, y similares.

"Inmediatamente adyacente" significa que no hay elementos intermedios entre los elementos inmediatamente adyacentes.

"Individual" o "sujeto" o "animal" significa un animal humano o no humano seleccionado para el tratamiento o terapia.

"Inhibir la expresión o actividad" se refiere a una reducción o bloqueo de la expresión o actividad de un ARN o proteínas y no indica necesariamente una eliminación total de la expresión o actividad.

"Resistencia a la insulina" se define como la condición en la que una cantidad normal de insulina son insuficientes para producir una respuesta normal de la insulina a partir de células de grasa, músculo y el hígado. Resistencia a la insulina en células de grasa da como resultado la hidrólisis de los triglicéridos almacenados, lo que eleva los ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo. resistencia a la insulina en el músculo reduce la captación de

glucosa mientras que la resistencia a la insulina en el hígado reduce el almacenamiento de la glucosa, sirviendo ambos efectos para elevar la glucosa en sangre. Altos niveles de plasma de insulina y glucosa debido a la resistencia a la insulina a menudo conduce al síndrome metabólico y diabetes de tipo 2.

5 "Sensibilidad a la insulina" es una medida del nivel de eficacia con el que un individuo procesa la glucosa. Un individuo que tiene una alta sensibilidad de la insulina procesa eficazmente la glucosa mientras que un individuo con baja sensibilidad a la insulina no procesa efectivamente glucosa.

"Enlace Internucleosídico" se refiere a la unión química entre nucleósidos.

10

"La administración intravenosa" significa administración en una vena.

"Nucleósidos enlazados" significa nucleósidos adyacentes que están unidos entre sí.

15

"Terapia hipolipemiente" o "agente reductor de lípidos" se refiere a un régimen terapéutico proporcionado a un sujeto para reducir uno o más lípidos en un sujeto. En ciertas realizaciones, se proporciona una terapia hipolipemiente para reducir uno o más de ApoB, colesterol total, LDL-C, VLDL-C, IDL-C, no-HDL-C, triglicéridos, partículas pequeñas densas de LDL y Lp(a) en un sujeto. Ejemplos de terapia de reducción de lípidos incluyen estatinas, fibratos e inhibidores de MTP.

20

"Principales factores de riesgo" se refiere a factores que contribuyen a un alto riesgo de una enfermedad o condición particular. En ciertas realizaciones, los principales factores de riesgo para la enfermedad cardíaca coronaria incluyen, sin limitación, el tabaquismo, hipertensión, niveles bajos de HDL-C, historia familiar de enfermedad coronaria del corazón, la edad y otros factores se describen aquí.

25

"Enfermedad metabólica" o "trastorno metabólico" se refiere a una afección caracterizada por una alteración o perturbación en la función metabólica. "Metabólico" y "metabolismo" son términos bien conocidos en la técnica y generalmente incluyen toda la gama de procesos bioquímicos que se producen dentro de un organismo vivo. Las enfermedades metabólicas o trastornos incluyen, pero no se limitan a, obesidad, diabetes, hiperglucemia, prediabetes, la enfermedad no alcohólica del hígado graso (NAFLD), síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética, o hipertrigliceridemia o una combinación de los mismos.

30

"Síndrome metabólico" se refiere a una condición caracterizada por una agrupación de lípidos y factores de riesgo cardiovascular no lipídicos de origen metabólico. En ciertas realizaciones, el síndrome metabólico se identifica por la presencia de cualesquiera 3 de los siguientes factores: circunferencia de la cintura superior a 102 cm en hombres o mayor que 88 cm en mujeres; triglicéridos en suero de al menos 150 mg/dl; HDL-C de menos de 40 mg/dl en hombres o menos de 50 mg/dl en mujeres; la presión arterial de al menos 130/85 mmHg; y la glucosa en ayunas de al menos 110 mg/dL. Estos determinantes se pueden medir fácilmente en la práctica clínica (JAMA, 2001, 285: 2486-2497).

40

"Falta de coincidencia" o "nucleobase no complementaria" se refiere al caso en que una nucleobase de un primer ácido nucleico no es capaz de aparearse con la nucleobase correspondiente de un segundo ácido nucleico o ácido nucleico de diana.

45

"Dislipidemia mixta" se refiere a una afección caracterizada por niveles elevados de colesterol y triglicéridos elevados.

"Enlace internucleosídico modificado" se refiere a una sustitución o cualquier cambio de un enlace internucleosídico natural (es decir, un enlace de internucleósido de fosfodiéster).

50

"Nucleobase modificada" se refiere a cualquier nucleobase distinta de adenina, citosina, guanina, timidina, o uracilo. Una "nucleobase no modificada" significa las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C), y uracilo (U).

55

"Nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado o nucleobase modificado.

"Nucleótido modificado" significa un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, enlace de internucleósido modificado, o nucleobase modificada. Un "nucleósido modificado" significa un nucleósido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado o nucleobase modificada.

60

"Oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido que comprende al menos un nucleótido modificado.

65

"Azúcar modificado" se refiere a la sustitución o el cambio de un azúcar natural.

"Motivo" significa que el patrón de regiones químicamente distintas en un compuesto antisentido.

"Inhibidor de MTP" significa que un agente inhibe la enzima, la proteína de transferencia de triglicéridos microsomales.

"Enlace internucleosídico natural" significa un enlace de fosfodiéster 3' a 5'.

"Resto de azúcar natural" significa un azúcar que se encuentra en el ADN (2'-H) o ARN (2'-OH).

"Enfermedad no alcohólica del hígado graso" o "NAFLD" significa una condición caracterizada por la inflamación grasa del hígado que no es debido a un uso excesivo de alcohol (por ejemplo, consumo de alcohol de más de 20 g/día). En ciertas realizaciones, NAFLD se relaciona con resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. NAFLD abarca un espectro de la enfermedad que van desde simple acumulación de triglicéridos en los hepatocitos (esteatosis hepática) para esteatosis hepática con la inflamación (esteatohepatitis), fibrosis y cirrosis.

"Esteatohepatitis no alcohólica" (EHNA) se produce a partir de la progresión de la NAFLD más allá de la deposición de los triglicéridos. Se necesita un "segundo golpe" capaz de inducir la necrosis, inflamación y fibrosis para el desarrollo de la EHNA. Los candidatos para el segundo golpe se pueden agrupar en categorías generales: factores que causan un aumento del estrés oxidativo y los factores que promueven la expresión de citocinas proinflamatorias

"Ácido nucleico" se refiere a moléculas compuestas de nucleótidos monoméricos. Un ácido nucleico incluye los ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos nucleicos monocatenarios, ácidos nucleicos de doble cadena, ácidos ribonucleicos pequeños (siARN), y microARN (miARN). Un ácido nucleico puede comprender también una combinación de estos elementos en una sola molécula.

"Nucleobase" significa un resto heterocíclico capaz de aparearse con una base de otro ácido nucleico.

"Secuencia de nucleobases" significa el orden de nucleobases contiguas independientes de cualquier azúcar, ligamiento, o modificación de nucleobases.

"Nucleósidos" se refiere a una base nitrogenada unida a un azúcar.

"Nucleósidos miméticos" incluye aquellas estructuras utilizadas para sustituir el azúcar o el azúcar y la base y no necesariamente la articulación en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como por ejemplo nucleósidos miméticos que tienen morfolino, ciclohexenilo, ciclohexilo, tetrahidropirano, miméticos de azúcar biciclos o triciclos por ejemplo unidades de azúcar no de furanosa.

"Nucleótido" significa un nucleósido que tiene un grupo de fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido.

"Nucleotide mimético" incluye aquellas estructuras utilizadas para reemplazar el nucleósido y el enlace en una o más posiciones de un compuesto oligomérico tal como por ejemplo ácidos nucleicos peptídicos o morfolinos (morfolinos unidos por -N(H)-C(=O)-O- u otro enlace no fosfodiéster).

"Compuesto oligomérico" o "oligómero" se refiere a una estructura polimérica que comprende dos o más subestructuras y es capaz de hibridar a una región de una molécula de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleósidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos son oligonucleótidos quiméricos.

"Oligonucleótido" significa un polímero de nucleósidos ligados cada uno de los cuales pueden ser modificados o no modificados, dependiendo uno de otro.

"Administración parenteral" se refiere a la administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal, o administración intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o intracerebroventricular. La administración puede ser continua o crónica, o corto o intermitente.

"Péptido" significa una molécula formada por la vinculación de al menos dos aminoácidos por enlaces amida. Péptido se refiere a polipéptidos y proteínas.

"Agente farmacéutico" se refiere a una sustancia que proporciona un beneficio terapéutico cuando se administra a una indicación particular. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido dirigido a PTP1B es agente farmacéutico.

"Composición farmacéutica" significa una mezcla de sustancias adecuadas para administración a un individuo. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender uno o más agentes activos y una solución acuosa estéril.

"Vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un medio o diluyente que no interfiere con la estructura del oligonucleótido. Ciertos de tales vehículos permiten que composiciones farmacéuticas se formulen como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y pastillas para la ingestión oral por un sujeto. Por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser una solución acuosa estéril.

"Derivado farmacéuticamente aceptable" abarca sales farmacéuticamente aceptables, conjugados, profármacos o isómeros de los compuestos descritos en la presente memoria.

"Sales farmacéuticamente aceptables" significa sales fisiológicas y farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del oligonucleótido progenitor y no imparten efectos toxicológicos no deseados.

"Enlace de fosforotioato" significa un enlace entre nucleósidos donde el enlace fosfodiéster se modifica mediante la sustitución de uno de los átomos de oxígeno no puente con un átomo de azufre. Un enlace fosforotioato es un enlace de internucleósido modificado.

"Porción" significa un número definido de nucleobases contiguas (es decir, enlaces) de un ácido nucleico. En ciertas realizaciones, una parte es un número definido de nucleobases contiguas de un ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una parte es un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido.

"Prevenir" se refiere a retrasar o prevenir la aparición o desarrollo de una enfermedad, trastorno, o condición por un período de tiempo de minutos a indefinidamente. Prevenir significa también la reducción del riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o condición.

"Profármaco" significa un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva que se convierte en una forma activa dentro del cuerpo o las células del mismo por la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos o condiciones.

"Proteína fosfatasa de tirosina 1B" o "PTP1B" (también conocido como PTPN1; proteína fosfatasa de tirosina, no receptor de tipo 1; PTP-1B; RKPTP) significa cualquier ácido nucleico o proteína de PTP1B.

"Expresión PTP1B" significa el nivel de ARNm transcrito a partir del gen que codifica PTP1B o el nivel de proteína traducida a partir del ARNm. La expresión de PTP1B puede ser determinada por métodos conocidos en la técnica tales como una transferencia de Northern o Western.

"Ácido nucleico de PTP1B" significa cualquier ácido nucleico que codifica PTP1B. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un ácido nucleico de PTP1B incluye una secuencia de ADN que codifica PTP1B, una secuencia de ARN transcrita a partir de ADN que codifica PTP1B (incluyendo el ADN genómico que comprende intrones y exones), y una secuencia de ARNm que codifica PTP1B. "ARNm de PTP1B" significa un ARNm que codifica una proteína PTP1B.

"Efectos secundarios" se refiere a respuestas fisiológicas atribuibles a un tratamiento aparte de los efectos deseados. En ciertas realizaciones, los efectos secundarios incluyen reacciones en el sitio de la inyección, anomalías en las pruebas de función hepática, anomalías en la función renal, toxicidad hepática, toxicidad renal, anomalías del sistema nervioso central, miopatías, y malestar general. Por ejemplo, el aumento de los niveles de aminotransferasas en suero pueden indicar toxicidad hepática o anomalías de la función hepática. Por ejemplo, bilirrubina incrementada puede indicar toxicidad hepática o anomalías de la función hepática.

"Oligonucleótido de cadena sencilla" significa un oligonucleótido que no se hibrida con una cadena complementaria.

"Hibridar específicamente" se refiere a un compuesto antisentido que tiene un grado suficiente de complementariedad entre un oligonucleótido antisentido y un ácido nucleico diana para inducir un efecto deseado, mientras que exhiben un mínimo o ningún efecto sobre los ácidos nucleicos no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* y tratamientos terapéuticos.

"Estatinas" significa un agente que inhibe la actividad de la reductasa de HMG-CoA.

"Administración subcutánea" se refiere a la administración justo debajo de la piel.

"Orientación" o "de diana" significa el proceso de diseño y selección de un compuesto antisentido que se hibrida específicamente con un ácido nucleico diana e inducir un efecto deseado.

"Ácido nucleico diana", "ARN diana" y "transcripción de ARN diana" se refieren todos a un ácido nucleico capaz de ser diana de compuestos antisentido.

"Segmento" significa la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico diana a la que está dirigido un compuesto antisentido. "Sitio diana en 5'" se refiere al nucleótidos más 5' de un segmento diana. "Sitio diana 3'" se refiere al nucleótido más 3' de un segmento diana.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente que proporciona un beneficio terapéutico a un individuo.

"Cambio de estilo de vida terapéutico" significa cambios en la dieta y estilo de vida destinados a reducir la masa de tejido colesterol y/o graso/adiposo. Tal cambio puede reducir el riesgo de desarrollar enfermedades del corazón, y puede incluir recomendaciones para la ingesta dietética de calorías diarias totales, la grasa total, grasa saturada, grasa poliinsaturada, grasa monoinsaturada, carbohidratos, proteínas, colesterol, fibra insoluble, así como recomendaciones para actividad física.

"Triglicéridos" o "TG" significa un lípido o grasa neutral que consiste de glicerol combinado con tres moléculas de ácido graso.

"Diabetes de tipo 2", (también conocido como "diabetes mellitus de tipo 2" o "diabetes mellitus de tipo 2", y "diabetes mellitus de tipo 2" antes denominada, "diabetes no dependiente de insulina (NIDDM)", "diabetes relacionada con la obesidad", o "diabetes del adulto") es un trastorno metabólico que se caracteriza principalmente por la resistencia a la insulina, deficiencia relativa de insulina y hiperglicemia.

"Tratar" se refiere a administrar una composición farmacéutica a un animal para efectuar una alteración o mejora de una enfermedad, trastorno, o condición.

"Nucleótido no modificado" significa un nucleótido compuesto de nucleobases de origen natural, restos de azúcares, y enlaces de internucleósido. En ciertas realizaciones, un nucleótido no modificado es un nucleótido de ARN (es decir β -D-ribonucleósidos) o un nucleótido de ADN (es decir, β -D-desoxirribonucleósido).

Ciertas realizaciones

Ciertas realizaciones describen métodos, compuestos y composiciones para inhibir la expresión de PTP1B.

Ciertas realizaciones describen compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de PTP1B es cualquiera de las secuencias expuestas en el n° de Acceso GenBank NM_002827.2 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1), n° de acceso GenBank NT_011362.9 truncado de los nucleótidos 14178000 a 14256000 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 2); y una concatenación de las secuencias de los exones 1-9, el intrón 9 y el exón 10 del andamio PTP1B de mono rhesus (que se incorpora en el presente documento como SEQ ID NO: 3).

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 10 a 30 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 10 a 30 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento pueden constar de 10 a 30 enlaces nucleósidos y tener una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-32 o 100-111.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento pueden constar de 10 a 30 enlaces de nucleósidos y tener una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de las SEQ ID NOs: 26 o 44.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento pueden constar de 10 a 30 nucleósidos enlazados y tener una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento pueden constar de 10 a 30 nucleósidos enlazados y tener una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

10 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 15 a 30 nucleósidos que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 15 a 30 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

20 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento pueden constar de 15 a 30 nucleósidos enlazados y tener una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-32. o 100-111.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento pueden constar de 15 a 30 nucleósidos enlazados y tener una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de las SEQ ID NOs: 26 o 44.

30 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento pueden constar de 15 a 30 nucleósidos enlazados y tener una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento pueden constar de 15 a 30 nucleósidos enlazados y tener una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

40 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 18 a 21 nucleósidos que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

45 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 18 a 21 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

50 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 18 a 21 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-32. o 39-49.

55 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 18 a 21 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de las SEQ ID NOs: 26 o 44.

60 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 18 a 21 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

65 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 18 a 21 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 bases nucleotídicas contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 35 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NOs: 4-32 o 50.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 35 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 35 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 35 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 30 nucleósidos que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 30 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 30 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 4-32 o 50.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 30 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 30 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438 472,

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 30 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 25 nucleósidos que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 25 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 25 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NOs: 4-32.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 25 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 25 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438 472.

10 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 25 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 24 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

20 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 24 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 24 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NOs: 4-32.

30 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 24 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26.

35 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 24 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

40 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 24 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

45 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 23 nucleósidos que tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

50 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 23 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

55 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 23 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NOs: 4-32.

60 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 23 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26.

65 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 23 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 23 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 22 nucleósidos que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 22 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 22 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NOs: 4-32.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 22 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 22 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 22 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 21 nucleósidos que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 21 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 nucleobases contiguas complementarias a una longitud igual porción de cualquiera de SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 21 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NOs: 4-32.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 21 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 21 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constan de 20 a 21 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de ISIS NO: 404173.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constarán de 20 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NOs: 4-32.

5 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento constarán de 20 nucleósidos enlazados y tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26.

10 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en la presente consisten en cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en el presente documento se componen de ISIS NO: 404.173.

15 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionadas en este documento consisten en SEQ ID NO: 26.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionadas en este documento comprenden una sal de oligonucleótido modificado.

20 En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionadas en este documento comprenden además un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

25 En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado es al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% complementarias a cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3 medidas sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

30 En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con una cualquiera de la SEQ ID NO: 4-32 o 39-50. tal como se mide sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

35 En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con una cualquiera de SEQ ID NO: 26 o 44. medido sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

40 En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con una cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438373, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472 como se mide sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

En ciertas realizaciones, la secuencia de nucleobase del oligonucleótido modificado tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con ISIS NO: 404173 tal como se mide sobre la totalidad del oligonucleótido modificado.

45 En ciertas realizaciones, el compuesto proporcionado en el presente documento consiste en un oligonucleótido monocatenario modificado.

50 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consta de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consta de 20 nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consta de 18 nucleósidos enlazados.

55 En ciertas realizaciones, al menos un enlace internucleosídico del oligonucleótido modificado es un enlace internucleosídico modificado. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato internucleosídico.

En ciertas realizaciones, al menos un nucleósido de dicho oligonucleótido modificado comprende una nucleobase modificada. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es una 5-metilcitosina.

60 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste en deoxinucleósidos enlazados; b) segmento de ala 5' que consiste en nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consiste en nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3' y cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado.

65 En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consta de 20 nucleósidos enlazados, el segmento de hueco que consiste en diez deoxinucleósidos enlazados, el segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos

enlazados, el segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados, cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado por 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consta de 20 nucleósidos enlazados, el segmento de hueco que consta de ocho deoxinucleósidos enlazados, el segmento de ala 5' que consta de seis nucleósidos enlazados, el segmento de ala 3' que consta de seis nucleósidos enlazados, cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consta de 20 nucleósidos enlazados, el segmento de hueco que consiste en trece deoxinucleósidos enlazados, el segmento de ala 5' que consta de dos nucleósidos enlazados, el segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados, cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido modificado consta de 18 nucleósidos enlazados, el segmento de hueco que consta de ocho deoxinucleósidos enlazados, el segmento 5' de ala que consta de cinco nucleósidos enlazados, el segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados, cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3, en el que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste en diez deoxinucleósidos enlazados; b) segmento de ala a 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre segmento de ala 3' y el de la segmento de ala 5', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 18 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 8 nucleobases contiguas complementarias a una porción de longitud igual de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3, en las que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consta de ocho deoxinucleósidos enlazados; b) segmento de ala 5' que consta de seis nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consta de seis nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 19 nucleobases contiguas de las SEQ ID NOs: 4-32, en las que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste de diez deoxinucleósidos enlazados; b) segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 19 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26, en el que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste en diez vinculado deoxinucleósidos; b) segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionadas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados tienen la secuencia de nucleobase de la SEQ ID NO: 26, en la que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste en diez deoxinucleósidos enlazados; b) segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre segmento de ala 5' y

el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que comprende al menos 19 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26 o 44, en la que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste en diez deoxinucleósidos enlazados; b) segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, el compuesto o composición comprende el compuesto de cualquiera de ISIS NOs: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NOs: 4-32, en el que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste en diez deoxinucleósidos enlazados; b) segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26, en el que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste en diez vinculado deoxinucleósidos; b) segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionadas en este documento comprenden un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de la SEQ ID NO: 26, en la que el oligonucleótido modificado comprende: a) un segmento de hueco que consiste en diez deoxinucleósidos enlazados; b) segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados; y c) un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados. El segmento de hueco está colocado entre segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, cada enlace internucleosídico es un enlace fosforotioato y cada residuo de citosina es una 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, el compuesto o composición comprende el compuesto ISIS NOs: 404.173.

Ciertas realizaciones describen métodos, compuestos y composiciones para inhibir la expresión de PTP1B.

Ciertas realizaciones describen un método de reducir la expresión de PTP1B en un animal que comprende la administración al animal de un compuesto como se describe en este documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 20 a 35 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 20 a 25 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 20 a 24 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 20 a 23 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 20 a 22 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 20 a 21 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado 20 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B.

Ciertas realizaciones describen un método de prevenir, mejorar o tratar una enfermedad metabólica en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado 20 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. Los ejemplos de enfermedades metabólicas o trastornos incluyen, pero no se limitan a la obesidad, diabetes, hiperglucemia, prediabetes, la enfermedad no alcohólica del hígado graso (NAFLD), síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética, o hipertrigliceridemia o una combinación de los mismos.

Ciertas realizaciones dan a conocer un método para reducir los niveles de glucosa en un animal que comprende administrar al animal un compuesto como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado de 10 a 30 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, el compuesto comprende un oligonucleótido modificado 20 nucleósidos enlazados de longitud dirigidos a PTP1B. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, aminora o trata una enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, alivia o trata la diabetes. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, alivia o trata la obesidad. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, alivia o trata el síndrome metabólico. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, alivia o trata la resistencia a la insulina. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, alivia o trata la hiperglucemia. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, mejora o trata NAFLD. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa en un animal previene, alivia o trata la dislipidemia diabética. En ciertas realizaciones, el nivel de glucosa se reduce en al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%.

En ciertas realizaciones, PTP1B tiene la secuencia como se expone en cualquiera de los números de acceso de GenBank N° de Acceso GENBANK NM_002827.2 (incorporados en el presente documento como SEQ ID NO: 1), n° de acceso GENBANK NT_011362.9 truncado de los nucleótidos 14.178.000-14256000 (incorporado en este documento como SEQ ID NO: 2); y una concatenación de secuencias de exones 1-9, el intrón 9 y el exón 10 del andamio PTP1B mono rhesus (que se incorpora en el presente documento como SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones, PTP1B tiene la secuencia humana como se establece en SEQ ID NOs: 1-2. En ciertas realizaciones, PTP1B tiene la secuencia de mono rhesus según se expone en SEQ ID NOs: 3).

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionadas en este documento comprenden una sal del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobase indicada en SEQ ID NOs: 4-32, 50 o una sal del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable o diluyente. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 25 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobase indicada en SEQ ID NOs: 4-32, 50 o una sal del mismo y un vehículo farmacéuticamente portador o diluyente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobase indicada en SEQ ID NO: 4-32, 50 o una sal del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable o diluyente.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones proporcionadas en este documento comprenden una sal del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobase indicada en SEQ ID NO: 26 o una sal del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable o diluyente. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 25 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobase indicada en SEQ ID NO: 26 o una sal del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable o diluyente. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobase indicada en SEQ ID NO: 26 o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en el presente documento comprenden una sal del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionadas de entre las secuencias de nucleobases recitadas en ISIS NOs: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472 o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 25 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobase seleccionada de entre las secuencias de nucleobases recitadas en ISIS NOs: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472 o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionadas de entre las secuencias de nucleobases recitadas en ISIS NOs: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472 o una sal del mismo y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones descritas en el presente documento comprenden una sal del mismo, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionadas de entre las secuencias de nucleobases recitadas en ISIS NO: 404173 o una de sus sales y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 25 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionadas de entre las secuencias de nucleobases recitadas en ISIS N°: 404173, o una sal del mismo y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobases seleccionadas de entre las secuencias de nucleobases recitadas en ISIS N°: 404173, o una sal del mismo y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Ciertas realizaciones describen un método para el tratamiento de un animal con una enfermedad o condición relacionada con PTP1B o que comprende: a) la identificación de dicho animal con la enfermedad o condición relacionada con PTP1B, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 10 a 30 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobase al menos 90% complementaria a cualquiera de SEQ ID NOs: 1-3 tal como se mide sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado al animal trata o reduce la enfermedad o condición relacionada con PTP1B, o un síntoma del mismo, en el animal. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con PTP1B es diabetes.

Ciertas realizaciones describen un método para el tratamiento de un animal con una enfermedad o condición relacionada con PTP1B o que comprende: a) la identificación de dicho animal con la enfermedad o condición relacionada con PTP1B, y b) administrar a dicho animal una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consiste de 20 nucleósidos enlazados y tiene una secuencia de nucleobase al menos 100% complementaria a cualquiera de SEQ ID NOs: 1-3, medida sobre la totalidad de dicho oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto administrado a los animales trata o reduce la enfermedad o condición relacionada con PTP1B, o un síntoma del mismo, en el animal. En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección relacionada con PTP1B es diabetes.

Ciertas realizaciones describen métodos para tratar, prevenir, o mejorar una enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica es la obesidad, diabetes, hiperglucemia, prediabetes, enfermedad no alcohólica de hígado graso (NAFLD), síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética, o hipertrigliceridemia o una combinación de los mismos.

Ciertas realizaciones describen métodos para tratar, prevenir, o mejorar un trastorno hiperproliferativo.

Ciertas realizaciones describen métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto como se describe en el presente documento a un animal. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobase indicada en SEQ ID NOs: 4-32 o 50. Ciertas realizaciones describen métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto como se describe en este documento a un animal. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 bases nucleotídicas contiguas de una secuencia de nucleobase indicada en SEQ ID NO: 26.

Ciertas realizaciones dan a conocer métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto como se describe en el presente documento a un animal. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobase seleccionada de entre las secuencias de nucleobases recitadas en ISIS NOs: 404173, 410002, 438383, 438445, 438454, 438463, o 438472.

Ciertas realizaciones describen métodos que comprenden administrar a un animal un compuesto como se describe en este documento a un animal. En ciertas realizaciones, el método comprende administrar a un animal un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados y que tiene una secuencia de nucleobases que comprende al menos 20 nucleobases contiguas de una secuencia de nucleobase seleccionada de entre las secuencias de nucleobases recitadas en ISIS NO: 404173.

En ciertas realizaciones, el animal es un humano.

En ciertas realizaciones, la administración previene, trata, alivia, o retrasa la progresión de una enfermedad metabólica como se describe aquí.

En ciertas realizaciones, la administración previene, trata, aminora, o retarda la progresión de la diabetes como se describe en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el compuesto se co-administra con un segundo agente.

En ciertas realizaciones, el compuesto y el segundo agente se administran concomitantemente.

En ciertas realizaciones, la administración es la administración parenteral.

Ciertas realizaciones dan a conocer además un método para reducir PTP 1 B mRNA o expresión de la proteína en un animal que comprende administrar al animal un compuesto o composición como se describe en el presente documento para reducir el ARNm de PTP1B o expresión de la proteína en el animal. En ciertas realizaciones, el animal es un humano. En ciertas realizaciones, la reducción de ARNm de PTP1B o expresión de la proteína previene, trata, aminora, o retarda la progresión de la enfermedad metabólica. En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica o afección es diabetes.

Ciertas realizaciones describen un método para el tratamiento de un ser humano con una enfermedad metabólica que comprende identificar al humano con la enfermedad y administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tratamiento reduce un síntoma seleccionado del grupo que consiste en el síndrome metabólico, la hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, aumento de los niveles de glucosa, aumento de la resistencia a la insulina, disminución de la sensibilidad a la insulina, por encima del peso corporal normal, y/o por encima de la grasa corporal normal o cualquier combinación de los mismos.

Ciertas realizaciones describen un método para el tratamiento de un humano con diabetes que comprende la identificación de la humana con la enfermedad y administrar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o composición como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, el tratamiento reduce un síntoma seleccionado del grupo que consiste en el síndrome metabólico, la hiperglucemia, hipertrigliceridemia, hipertensión, aumento de los niveles de glucosa, aumento de la resistencia a la insulina, disminución de la sensibilidad a la insulina, por encima del peso corporal normal, y/o por encima de la grasa corporal normal o cualquier combinación de los mismos.

Se describe además un método para reducir o prevenir la enfermedad metabólica que comprende administrar a un ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto o composición como se describe aquí, reducir o prevenir la enfermedad metabólica de este modo.

Además se describe un método para reducir o prevenir la diabetes que comprende administrar a un ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto o composición como se describe en el presente documento, la reducción o prevención de la diabetes de ese modo.

También se describe un método para mejorar un síntoma de enfermedad metabólica, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados, en el que dicho oligonucleótido modificado se hibrida específicamente con SEQ ID NO: 1, 2, o 3, mejorando de este modo un síntoma de enfermedad metabólica en el humano.

Además se describe un método para mejorar un síntoma de diabetes, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consta de 10 a 30 nucleósidos enlazados, en el que dicho oligonucleótido modificado se hibrida específicamente con SEQ ID NO: 1, 2, o 3, mejorando de este modo un síntoma de diabetes en el ser humano.

Además se describe un método para mejorar un síntoma de diabetes, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados, en el que dicho oligonucleótido modificado se hibrida específicamente con SEQ ID NO: 1, 2, o 3, mejorando de este modo un síntoma de diabetes en el ser humano.

Además se describe un método para reducir la tasa de progresión de un síntoma asociado con enfermedades metabólicas, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que comprende 10 a 30 nucleósidos enlazados, en el que dicho oligonucleótido modificado se hibrida específicamente con SEQ ID NO: 1, 2, o 3, reduciendo así la tasa de progresión de un síntoma de enfermedad metabólica en el humano.

Además se describe un método para reducir la tasa de progresión de un síntoma asociado con la diabetes, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo un compuesto que comprende un oligonucleótido

modificado que consta de 20 a 35 nucleósidos enlazados, en el que dicho oligonucleótido modificado se hibrida específicamente con SEQ ID NO: 1, 2, o 3, reduciendo así la tasa de progresión de un síntoma de diabetes en el ser humano.

Además se describe un método para reducir la tasa de progresión de un síntoma asociado con la diabetes, que comprende administrar a un humano en necesidad del mismo un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que consta de 20 nucleósidos enlazados, en el que dicho oligonucleótido modificado se hibrida específicamente con SEQ ID NO: 1, 2, o 3, reduciendo así la tasa de progresión de un síntoma de diabetes en el ser humano.

También se describen métodos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención, o mejora de una enfermedad metabólica.

También se describen métodos y compuestos para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención, o mejora de la diabetes.

Ciertas realizaciones describen el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, mejorar, o prevenir la enfermedad metabólica.

Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, mejorar, o prevenir la diabetes.

Ciertas formas de realización proporcionan un compuesto como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención, o mejora de las enfermedades metabólicas tal como se describe en el presente documento por la terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

Ciertas formas de realización proporcionan un compuesto como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento, prevención, o mejora de la diabetes como se describe en el presente documento por la terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en este documento en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar enfermedades metabólicas tal como se describe en el presente documento por la terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en este documento en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar la diabetes como se describe en el presente documento por la terapia de combinación con un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento. Los agentes o terapias pueden coadministrarse o administrarse de forma concomitante.

Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en este documento en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar enfermedades metabólicas tal como se describe en la presente memoria en un paciente al que posteriormente se administra un agente adicional o terapia como se describe aquí.

Ciertas realizaciones proporcionan el uso de un compuesto como se describe en este documento en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar la diabetes como se describe en la presente memoria en un paciente al que se administra posteriormente un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento.

Ciertas formas de realización proporcionan un kit para tratar, prevenir o mejorar enfermedades metabólicas tal como se describe en el presente documento en el que el kit comprende:

- (i) un compuesto tal como se describe en este documento; y, alternativamente,
- (ii) un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento.

Ciertas formas de realización proporcionan un kit para tratar, prevenir o mejorar la diabetes como se describe aquí en donde el kit comprende:

- (i) un compuesto tal como se describe en este documento; y, alternativamente,
- (ii) un agente o terapia adicional como se describe en el presente documento.

Un kit como se describe en el presente documento puede incluir además instrucciones para usar el kit para tratar, prevenir, o mejorar la enfermedad metabólica, como se describe en el presente documento por la terapia de combinación como se describe aquí. En ciertas realizaciones, la enfermedad metabólica es la diabetes.

5 *Compuestos de antisentido*

Los compuestos oligoméricos incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos, oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos, compuestos antisentido, oligonucleótidos antisentido, y siARNs. Un compuesto oligomérico puede ser "antisentido" a un ácido nucleico diana, el sentido de que es capaz de experimentar la hibridación con un ácido nucleico diana a través de puentes de hidrógeno.

En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido. En ciertas de dichas realizaciones, un oligonucleótido antisentido tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso del segmento diana de un ácido nucleico diana al que está dirigido.

En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de PTP1B es de 10 a 30 nucleótidos de longitud. En otras palabras, los compuestos de antisentido son de 10 a 30 nucleobases enlazadas. En otras realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consta de 8 a 80, 10 a 50, 15 a 30, 18 a 21, 20 a 80, 20 a 35, 20 a 30, 20 a 29, 20 a 28, 20 a 27, 20 a 26, 20 a 25, 20 a 24, 20 a 23, 20 a 22, 20 a 21 o 20 nucleobases enlazadas. En ciertas de dichas realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado que consta de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o 80 nucleobases enlaces de longitud, o un rango definido por dos cualesquiera de los valores anteriores.

En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido comprende un oligonucleótido modificado acortado o truncado. El oligonucleótido modificado acortado o truncado puede tener un único nucleósido suprimido del extremo 5' (truncamiento 5'), o alternativamente desde el extremo 3' (truncamiento 3'). Un oligonucleótido acortado o truncado puede tener dos nucleósidos eliminados del extremo 5', o, alternativamente, puede tener dos subunidades eliminadas desde el extremo 3'. Alternativamente, los nucleósidos eliminados se pueden dispersar en todo el oligonucleótido modificado, por ejemplo, en un compuesto antisentido que tiene un nucleósido borrado de extremo 5' y un nucleósido borrado del extremo 3'.

Cuando un solo nucleósido adicional está presente en un oligonucleótido alargado, el nucleósido adicional puede estar situado en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. Cuando dos o más adicionales nucleósidos están presentes, los nucleósidos adicionales pueden ser adyacentes entre sí, por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene dos nucleósidos añadidos al extremo 5' (adición 5'), o alternativamente al extremo 3' (adición 3'), del oligonucleótido. Alternativamente, el nucleósido añadido puede dispersarse por todo el compuesto antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene un nucleósido añadido al extremo 5' y una subunidad añadida al extremo 3'.

Es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido, tal como un oligonucleótido antisentido, y/o introducir bases de desajuste sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. (Proc Natl Acad Sci EE.UU. 89: 7305 a 7.309, 1992), una serie de oligonucleótidos antisentido 13-25 nucleobases de longitud se ensayaron para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN diana en un modelo de inyección de oocitos. Los oligonucleótidos antisentido de 25 nucleobases de longitud con 8 o 11 bases de desajuste cerca de los extremos de los oligonucleótidos antisentido fueron capaces de dirigir la escisión específica del ARNm diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos antisentido que no contenían desajustes. Del mismo modo, el objetivo específico de escisión se consiguió usando 13 oligonucleótidos antisentido de nucleobase, incluyendo aquellos con 1 o 3 desajustes.

Gautschi et al (J. Natl Cancer Inst. 93: 463-471, marzo de 2001) demostró la capacidad de un oligonucleótido que tiene 100% de complementariedad con el ARNm de bcl-2 y que tiene 3 desajustes a mARN de bcl-xL para reducir la expresión tanto de Bcl-2 como de Bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Además, este oligonucleótido demostró actividad antitumoral potente *in vivo*.

Maher y Dolnick (Nuc Acid Res 16: 3341-3358, 1988) examinaron una serie de oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases tándem, y oligonucleótidos antisentido de 28 y 42 nucleobases compuestas de la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos antisentido en tándem, respectivamente, por su capacidad para detener traducción de DHFR humana en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos antisentido de 14 nucleobases solo era capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los 28 o 42 oligonucleótidos antisentido de nucleobases.

65 *Motivos de compuesto antisentido*

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B tienen subunidades modificadas químicamente dispuestas en patrones, o motivos, para conferir a las propiedades de compuestos de antisentido tales como la actividad inhibidora mejorada, afinidad de unión incrementada para un ácido nucleico diana, o la resistencia a la degradación por nucleasas *in vivo*.

Compuestos de antisentido quiméricos contienen típicamente al menos una región modificada de modo que confieren una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, captación celular incrementada, afinidad de unión incrementada para el ácido nucleico diana, y/o aumento de la actividad inhibidora. Una segunda región de un compuesto antisentido quimérico puede servir opcionalmente como un sustrato para la endonucleasa celular ARNasa H, que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN.

Los compuestos de antisentido que tienen un motivo de gápmo se consideran compuestos de antisentido quiméricos. En un gápmo se posiciona una región interna que tiene una pluralidad de nucleótidos que soporta ARNseH de escisión entre las regiones exteriores que tienen una pluralidad de nucleótidos que son químicamente distintos de los nucleósidos de la región interna. En el caso de un oligonucleótido antisentido que tiene un motivo gápmo, el segmento de hueco generalmente sirve como sustrato para la escisión de endonucleasa, mientras que los segmentos de ala comprenden nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, las regiones de un gápmo se diferencian por los tipos de restos de azúcar que comprenden cada región distinta. Los tipos de restos de azúcar que se utilizan para diferenciar las regiones de un gápmo pueden, en algunas realizaciones, incluir β -D-ribonucleósidos, β -D-desoxirribonucleósidos, nucleósidos modificados en 2' (por ejemplo, los nucleósidos modificados en 2' pueden incluir 2'-MOE y 2'-O-CH₃, entre otros), y el azúcar bicíclico modificado (tales nucleósidos bicíclicos modificados en el azúcar pueden incluir los que tienen un acetato constreñido). En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir varios restos de azúcar modificados, incluyendo, por ejemplo, 2'-MOE y etilo constreñido. En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir varios modificados y no modificados restos de azúcar. En ciertas realizaciones, las alas pueden incluir diversas combinaciones de nucleósidos de 2'-MOE, nucleósidos de etilo limitados, y 2'-deoxinucleósidos.

Cada región distinta puede comprender restos uniformes de azúcar, variante, o restos de azúcar alternos. El motivo ala-hueco-ala se describe con frecuencia como "XYZ", donde "X" representa la longitud de ala 5', "Y" representa la longitud de la brecha, y "Z" representa la longitud de ala 3'. "X" y "Z" pueden comprender restos de azúcar uniformes, variantes, o alternos. En ciertas realizaciones, "X" e "Y" puede incluir uno o más 2'-deoxinucleósidos. "Y" puede comprender 2'-deoxinucleósidos. Tal como se usa en este documento, un gápmo descrito como "XYZ" tiene una configuración tal que la brecha se coloca inmediatamente adyacente a cada uno de ala 5' y ala 3'. Por lo tanto, no existen nucleótidos intermedios entre el ala 5' y el hueco, o la brecha y el extremo 3' del ala. Cualquiera de los compuestos de antisentido descritos en este documento pueden tener un motivo gápmo. En ciertas realizaciones, "X" y "Z" son los mismos, en otras realizaciones son diferentes. En ciertas realizaciones, "Y" es de entre 8 y 15 nucleósidos. X, Y, o Z puede ser cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30 o más nucleósidos.

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B poseen un motivo gápmo 5-10-5.

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B poseen un motivo gápmo 6-8-6.

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B poseen un motivo gápmo 5-8-5.

En ciertas realizaciones, un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de PTP1B tiene un motivo de hueco ensanchado.

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B tienen un motivo 2-13-5 de hueco ensanchado.

Ácidos nucleicos diana, regiones diana y secuencias de nucleótidos

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico de PTP1B es cualquiera de las secuencias expuestas en el GenBank nº de Acceso NM_002827.2 (incorporado en el presente documento como SEQ ID NO: 1), nº de acceso GenBank NT_011362.9 truncado de nucleótidos 14178000-14256000 (incorporado en este documento como SEQ ID NO: 2); y una concatenación de las secuencias de los exones 1-9, el intrón 9 y el exón 10 del andamio PTP1B de mono rhesus (que se incorpora en el presente documento como SEQ ID NO: 3).

Se entiende que la secuencia expuesta en cada SEQ ID NO en los ejemplos contenidos en este documento es independiente de cualquier modificación de un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Como tales, compuestos de antisentido definidos por una SEQ ID NO pueden comprender, de forma independiente, una o más modificaciones en un resto azúcar, un enlace internucleosídico o una base nucleotídica. Los compuestos

de antisentido descritos por un Número Isis (N° Isis) indican una combinación de secuencia de nucleobase y el motivo.

En ciertas realizaciones, una región diana es una región estructuralmente definida del ácido nucleico diana. Por ejemplo, una región diana puede abarcar una 3' UTR, una 5' UTR, un exón, un intrón, una unión exón/intrón, una región codificadora, una región de iniciación de traducción, región de terminación de la traducción, o cualquier otra región de ácido nucleico definido. Las regiones estructuralmente definidas para PTP1B pueden obtenerse por el número de acceso de las bases de datos de secuencias tales como NCBI y tal información se incorpora aquí por referencia. En ciertas realizaciones, una región diana puede abarcar la secuencia de un sitio diana 5' de un segmento diana dentro de la región de destino a un sitio diana 3' de otro segmento diana dentro de la misma región objetivo.

La focalización incluye la determinación de al menos un segmento diana al que se hibrida un compuesto antisentido, de tal manera que se produce un efecto deseado. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es una reducción en los niveles de ARNm diana de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el efecto deseado es la reducción de los niveles de la proteína codificada por el ácido nucleico diana o un cambio fenotípico asociado con el ácido nucleico diana.

Una región diana puede contener uno o más segmentos objetivo. Múltiples segmentos diana dentro de una región diana pueden ser superpuestos. Alternativamente, pueden ser no solapantes. En ciertas realizaciones, los segmentos de destino dentro de una región diana están separados por no más de aproximadamente 300 nucleótidos. En ciertas realizaciones, segmentos diana dentro de una región diana están separados por un número de nucleótidos, es decir, es aproximadamente, no es más que, es no más de aproximadamente, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, o 10 nucleótidos en el ácido nucleico diana, o es un rango definido por dos cualesquiera de los valores precedentes. En ciertas realizaciones, los segmentos de destino dentro de una región diana están separados por no más de, o no más de aproximadamente, 5 nucleótidos en el ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, los segmentos diana son contiguos. Se contemplan las regiones diana definidas por un intervalo que tiene un ácido nucleico de partida que es cualquiera de sitios diana 5' o sitios diana 3' que figuran en el presente documento.

Segmentos diana adecuados se pueden encontrar dentro de un 5' UTR, una región codificante, 3' UTR, un intrón, un exón, o una unión exón/intrón. Segmentos diana que contienen un codón de inicio o un codón de parada también son segmentos diana adecuados. Un segmento diana adecuado puede excluir específicamente una cierta región estructuralmente definida como el codón de inicio o codón de parada.

La determinación de segmentos diana adecuados pueden incluir una comparación de la secuencia de un ácido nucleico diana con otras secuencias de todo el genoma. Por ejemplo, el algoritmo BLAST se puede utilizar para identificar regiones de similitud entre diferentes ácidos nucleicos. Esta comparación puede prevenir la selección de secuencias de compuesto antisentido que puede hibridar de manera no específica a secuencias distintas de un ácido nucleico diana seleccionado (es decir, secuencias no diana o fuera de diana).

Puede haber variación en la actividad (por ejemplo, como se define por la reducción porcentual de niveles de ácido nucleico diana) de los compuestos de antisentido dentro de una región diana activa. En ciertas realizaciones, las reducciones en los niveles de PTP1B de ARNm son indicativos de la inhibición de la expresión de PTP1B. Las reducciones en los niveles de una proteína PTP1B también son indicativos de la inhibición de la expresión de ARNm diana. Además, los cambios fenotípicos son indicativos de la inhibición de la expresión de PTP1B. En ciertas realizaciones, la reducción de los niveles de glucosa, niveles de lípidos reducidos, y la reducción de peso corporal puede ser indicativa de la inhibición de la expresión de PTP1B. En ciertas realizaciones, la mejora de los síntomas asociados con la enfermedad metabólica puede ser indicativa de la inhibición de la expresión de PTP1B. En ciertas realizaciones, la mejora de los síntomas asociados con la diabetes puede ser indicativa de la inhibición de la expresión de PTP1B. En ciertas realizaciones, la reducción de la resistencia a la insulina es indicativa de inhibición de la expresión de PTP1B. En ciertas realizaciones, la reducción de los biomarcadores de la diabetes puede ser indicativa de la inhibición de la expresión de PTP1B.

Hibridación

En algunas realizaciones, la hibridación se produce entre un compuesto antisentido descrito en este documento y un ácido nucleico de PTP1B. El mecanismo más común de la hibridación implica enlaces de hidrógeno (por ejemplo, enlace de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso) entre nucleobases complementarias de las moléculas de ácidos nucleicos.

La hibridación puede producirse bajo condiciones variables. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y se determinan por la naturaleza y composición de las moléculas de ácido nucleico a hibridarse.

Los métodos para determinar si una secuencia es específicamente hibridable con un ácido nucleico diana son bien conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido proporcionados en este documento son específicamente hibridables con un ácido nucleico de PTP1B.

5 *Complementariedad*

Un compuesto antisentido y un ácido nucleico diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de nucleobases del compuesto antisentido puede enlazarse por hidrógeno con las correspondientes nucleobases del ácido nucleico diana, de tal manera que un efecto deseado se producirá (por ejemplo, la inhibición antisentido de un diana de ácido nucleico, tal como un ácido nucleico de PTP1B).

Un compuesto antisentido puede hibridarse por uno o más segmentos de un ácido nucleico de PTP1B tal que segmentos intervinientes o adyacentes no están involucrados en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de bucle, desajuste o estructura de horquilla).

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido descritos aquí, o una porción especificada de la misma, son, o son al menos, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% complementario a un ácido nucleico de PTP1B, una región diana, el segmento diana, o parte especificada de la misma. La complementariedad porcentual de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana se puede determinar utilizando métodos rutinarios.

Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases del compuesto antisentido son complementarias a una región objetivo, y por lo tanto se hibridarían específicamente, representarían el 90 por ciento de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden ser agrupadas o intercaladas con nucleobases complementarias y no necesitan ser contiguas entre sí o a nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que es de 18 nucleobases de longitud que tiene 4 (cuatro) nucleobases no complementarias que están flanqueadas por dos regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico diana tendrían 77,8% de complementariedad en general con el ácido nucleico diana y se describe en el presente documento. Complementariedad porcentual de un compuesto antisentido con una región de un ácido nucleico diana puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsqueda de alineamiento local básico) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403 410; Zhang y Madden, Genome Res, 1997, 7, 649 656). El porcentaje de homología, la identidad de secuencia o la complementariedad, se pueden determinar mediante, por ejemplo, el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), utilizando la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482 489).

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido proporcionados en el presente documento, o partes especificadas de la misma, son totalmente complementarios (es decir, 100% complementarios) a un ácido nucleico diana, o una porción especificada del mismo. Por ejemplo, el compuesto antisentido puede ser totalmente complementario a un ácido nucleico de PTP1B, o una región diana, o un segmento diana o secuencia diana de la misma. Como se usa en este documento, "totalmente complementario" significa que cada nucleobase de un compuesto antisentido es capaz de apareamiento de bases preciso con las nucleobases correspondientes de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, un compuesto antisentido de 20 nucleobases es totalmente complementario a una secuencia diana que es de 400 nucleobases de longitud, siempre que hay una correspondiente porción de 20 nucleobases del ácido nucleico diana que es totalmente complementaria al compuesto antisentido. Totalmente complementario también se puede utilizar en referencia a una porción especificada del primer y/o el segundo ácido nucleico. Por ejemplo, una porción de 20 nucleobases de un compuesto antisentido de 30 nucleobases puede ser "totalmente complementaria" a una secuencia diana que es de 400 nucleobases de longitud. La porción de 20 nucleobases del oligonucleótido de 30 nucleobases es totalmente complementaria a la secuencia diana si la secuencia diana tiene una parte de 20 nucleobases correspondiente en la que cada nucleobase es complementaria a la porción de 20 nucleobases del compuesto antisentido. Al mismo tiempo, todo el compuesto antisentido de 30 nucleobases puede o puede no ser totalmente complementario a la secuencia diana, dependiendo de si los 10 nucleobases restantes del compuesto antisentido también son complementarios a la secuencia diana.

La ubicación de una nucleobase no complementaria puede estar en el extremo 5' o extremo 3' del compuesto antisentido. Alternativamente, la nucleobase o nucleobases no complementarias pueden estar en una posición interna del compuesto antisentido. Cuando dos o más nucleobases no complementarias están presentes, pueden ser contiguas (es decir, unidas) o no contiguas. En una realización, una nucleobase no complementaria se encuentra en el segmento de ala de un oligonucleótido antisentido gápmero.

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido que son, o son de hasta 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleobases de longitud comprenden no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase no complementaria con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico de PTP1B, o porción especificada de la misma.

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido que son, o son de hasta 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleobases de longitud comprenden no más de 6, no más de 5, no más de 4, no más de 3, no más de 2, o no más de 1 nucleobase no complementaria con respecto a un ácido nucleico diana, tal como un ácido nucleico de PTP1B, o porción especificada de la misma.

Los compuestos de antisentido proporcionados en este documento también incluyen los que son complementarios a una porción de un ácido nucleico diana. Tal como se usa en el presente documento, "parte" se refiere a un número definido de nucleobases contiguas (es decir, enlaces) dentro de una región o segmento de un ácido nucleico diana. Una "porción" también puede referirse a un número definido de nucleobases contiguas de un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 8 nucleobase de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 12 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 13 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 14 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 15 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 16 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 17 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 18 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 19 nucleobases de un segmento diana. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido son complementarios a al menos una porción de 20 nucleobases de un segmento diana. También se contemplan compuestos de antisentido que son complementarios a al menos una porción de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más nucleobases de un segmento diana, o un rango definido por dos cualquiera de estos valores.

Identidad

Los compuestos de antisentido proporcionados en este documento también pueden tener una identidad porcentual definida a una secuencia particular de nucleótidos, SEQ ID NO, o compuesto representado por un número Isis específico, o porción del mismo. Tal como se usa en este documento, un compuesto antisentido es idéntico a la secuencia descrita en el presente documento si tiene la misma capacidad de nucleobase de emparejamiento. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en una secuencia de ADN descrita se consideraría idéntico a la secuencia de ADN ya que tanto uracilo como timidina se emparejan con adenina. Versiones acortadas y alargadas de los compuestos de antisentido descritos en este documento, así como compuestos que tienen bases no idénticas en relación con los compuestos de antisentido proporcionados en este documento también se contemplan. Las bases no idénticas pueden estar adyacentes entre sí o dispersarse en todo el compuesto antisentido. El porcentaje de identidad de un compuesto antisentido se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen idéntico apareamiento de bases con respecto a la secuencia a la que se está comparando.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido, o porciones de los mismos, son al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% idéntica a uno o más de los compuestos de antisentido o SEQ ID NOs, o una porción del mismo, descrita en este documento.

Modificaciones

Un nucleósido es una combinación de base-azúcar. La parte de nucleobase (también conocida como base) del nucleósido es normalmente un resto de base heterocíclica. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar vinculado al resto de hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Los oligonucleótidos se forman a través de la unión covalente de los nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. Dentro de la estructura de oligonucleótidos, los grupos de fosfato se conocen comúnmente como la formación de los enlaces de internucleósido del oligonucleótido.

Las modificaciones de los compuestos de antisentido comprenden sustituciones o cambios a enlaces internucleosídicos, restos de azúcar, o nucleobases. Compuestos de antisentido modificados se prefieren a menudo sobre las formas nativas debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad aumentada para el ácido nucleico diana, mayor estabilidad en presencia de nucleasas, o aumento de la actividad inhibidora.

Nucleósidos químicamente modificados también se pueden emplear para aumentar la afinidad de unión de un oligonucleótido antisentido acortado o truncado por su ácido nucleico diana. En consecuencia, los resultados comparables pueden obtenerse a menudo con compuestos de antisentido cortos que tienen tales nucleósidos modificados químicamente.

Enlaces de internucleósido modificados

El enlace internucleosídico de origen natural de ARN y ADN es un enlace de fosfodiéster 3' a 5'. Los compuestos de antisentido que tienen uno o más enlaces de internucleósido modificados, es decir de origen no natural, se seleccionan a menudo más compuestos de antisentido que tienen enlaces de internucleósido naturales debido a propiedades deseables tales como, por ejemplo, una mayor absorción celular, una mayor afinidad para los ácidos nucleicos diana, y el aumento de estabilidad en presencia de nucleasas.

Los oligonucleótidos que tienen enlaces de internucleósido modificados incluyen enlaces de internucleósido que retienen un átomo de fósforo, así como enlaces de internucleósido que no tienen un átomo de fósforo. Enlaces de internucleósido que contienen fósforo representativo incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamido, y fosforotioatos. Los métodos de preparación de los enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos.

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B comprenden uno o más enlaces de internucleósido modificados. En ciertas realizaciones, los enlaces de internucleósido modificados son enlaces de fosforotioato. En ciertas realizaciones, cada enlace internucleosídico de un compuesto antisentido es un enlace internucleosídico de fosforotioato.

Restos de azúcar modificados

Los compuestos de antisentido proporcionados en este documento pueden contener opcionalmente uno o más nucleósidos en el que el grupo azúcar se ha modificado. Tales nucleósidos modificados de azúcar pueden impartir estabilidad de nucleasa mejorada, aumento de la afinidad de unión, o alguna otra propiedad biológica beneficiosa para los compuestos antisentido. En ciertas realizaciones, los nucleósidos comprenden un resto de anillo de ribofurano modificado químicamente. Los ejemplos de anillos químicamente modificados de ribofurano incluyen, sin limitación, la adición de grupos sustituyentes (incluyendo grupos sustituyentes 5' y 2'); puente de átomos en el anillo no geminales para formar ácidos nucleicos bicíclicos (BNA); sustitución del átomo de oxígeno del anillo de ribosilo con S, N(R), o C(R1) (R)2 (R = H, C₁-C₁₂ alquilo o un grupo protector); y sus combinaciones. Ejemplos de azúcares químicamente modificados incluyen, nucleósido sustituido 2'-F-5'-metilo (véase, solicitud internacional PCT WO2008/101157, publicada el 8/21/08 para los otros nucleósidos sustituidos 5', 2'-bis), sustitución del átomo de oxígeno del anillo ribosilo con S con sustitución adicional en la posición 2 (véase, solicitud de patente publicada de Estados Unidos US2005/0130923, publicada el 16 de junio, 2005), o, alternativamente, sustitución 5' de un BNA (véase, solicitud internacional PCT WO2007/134181, publicada el 11/22/07, en el que LNA está sustituido con, por ejemplo, un grupo 5'-metilo o 5'-vinilo).

Ejemplos de nucleósidos modificados que tienen restos de azúcar incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden grupos sustituyentes de 5'-vinilo, 5'-metilo (R o S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH₃, y 2'-O(CH₂)₂OCH₃. El sustituyente en la posición 2' también puede ser seleccionada de alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C₁-C₁₀ alquilo, OCF₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂-O-N (Rm) (Rn), y O-CH₂-C(=O)-N (Rm)(Rn), donde cada Rm y Rn es, independientemente, H o C₁-C₁₀ alquilo sustituido o no sustituido.

Tal como se usa en este documento, "nucleósidos bicíclicos" se refieren a nucleósidos modificados que comprenden un resto de azúcar bicíclico. ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre átomos de anillo de ribosilo 4' y 2'. En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido descritos en este documento incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos en el que el puente comprende un nucleósido bicíclico 4' a 2'. Ejemplos de tales nucleósidos bicíclicos 4' a 2', incluyen, pero no se limitan a, una de las fórmulas: 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2', y análogos de los mismos (véase, Patente de Estados Unidos 7.399.845, expedida el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2', y análogos de los mismos (véase, Solicitud Internacional PCT publicada WO2009/006478, publicada el 8 de enero de 2009); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2', y análogos de los mismos (véase, publicada PCT Solicitud Internacional WO2008/150729, publicado diciembre 11, 2008); 4'-CH₂-ON (CH₃) -2' (véase, publicada Solicitud de Patente de Estados Unidos US2004/0171570, publicada el 2 de septiembre del 2004); 4'-CH₂-N(R)-O-2', en donde R es H, C₁-C₁₂ alquilo, o un grupo protector (véase, Patente de Estados Unidos 7.427.672, expedida el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH₂-C(H) (CH₃)-2' (véase, Chattopadhyaya, et al., J. Org Chem, 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂-C(=CH₂)-2', y análogos de los mismos (véase, publicada Solicitud Internacional PCT WO2008/154401, publicada el 8 de diciembre, 2008). También véase, por ejemplo: Singh et al., Chem. Commun, 1998, 4, 455-456.; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3.607 a 3.630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 2000, 97, 5633 a 5638; Kumar et al., Bioorg. Medicina. Chem. Lett, 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem, 1998, 63, desde 10.035-10.039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 129 (26) 8362-8379 (jul 4, de 2007); Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol, 2001, 8, 1-7; Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther, 2001, 3, 239-243; Nos de Patente de EE.UU. 6.670.461, 7.053.207, 6.268.490, 6.770.748, 6.794.499, 7.034.133, 6.525.191, 7.399.845; Las solicitudes internacionales PCT publicadas WO2004/106356, WO 94/14226, WO2005/021570 y WO2007/134181; La Publicación de Patente de Estados Unidos N° US2004/0171570, US2007/0287831 y US2008/0039618; y la patente de EE.UU. n° de serie 12/129.154, 60/989.574, 61/026.995, 61/026.998, 61/056.564, 61/086.231, 61/097.787 y 61/099.844; y la Solicitud Internacional PCT Nos.

PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154, y PCT/US2008/068922. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores se puede preparar con una o más configuraciones estereoquímicas de azúcar incluyendo, por ejemplo α -L-ribofuranosa y β -D-ribofuranosa (véase solicitud internacional PCT PCT/DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como WO 99/14226).

En ciertas realizaciones, restos de azúcares bicíclicos de nucleósidos BNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y la posición 2' del resto de azúcar de pentofuranosilo en el que dichos puentes comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 grupos enlazados seleccionados independientemente de $-[C(R_a)(R_b)]_n$ -, $-C(R_a)=C(R_b)$ -, $-C(R_a)=N$ -, $-C(=NR_a)$ -, $-C(=O)$ -, $-C(=S)$ -, $-O$ -, $-Si(R_a)_2$ -, $-S(=O)_x$ -, y $-N(R_a)$ -, donde:

x es 0, 1, o 2;

n es 1, 2, 3, o 4;

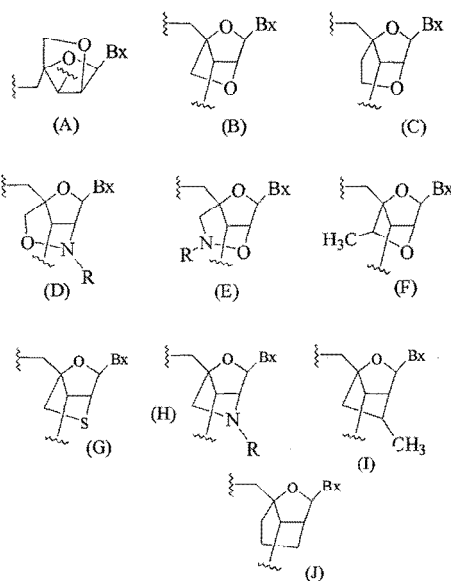
cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, C_1 - C_{12} alquilo, C_1 - C_{12} alquilo sustituido, C_2 - C_{12} alqueno, C_2 - C_{12} alqueno sustituido, C_2 - C_{12} alquino, C_2 - C_{12} alquino sustituido, C_5 - C_{20} arilo, C_5 - C_{20} arilo sustituido, heterociclo radical, heterociclo sustituido radical, heteroarilo, heteroarilo sustituido, C_5 - C_7 radical alicíclico, C_5 - C_7 alicíclico radical sustituido, halógeno, C_1 , NJ_1J_2 , SJ_1 , N_3 , $COOJ_1$, acilo ($C(=O)$ -H), acilo sustituido, CN, sulfonilo ($S(=O)_2$ - J_1), O sulfoxilo ($S(=O)$ - J_1); y

cada J_1 y J_2 es, independientemente, H, C_1 - C_{12} alquilo, alquilo sustituido C_1 - C_{12} alquilo, C_2 - C_{12} alqueno, C_2 - C_{12} alqueno sustituido, C_2 - C_{12} alquino, C_2 - C_{12} alquino sustituido, C_5 - C_{20} arilo, C_5 - C_{20} arilo sustituido, acilo ($C(=O)$ -H), acilo sustituido, heterociclo, un radical heterociclo sustituido, C_1 - C_{12} aminoalquilo, C_1 - C_{12} aminoalquilo sustituido, o un grupo Protector.

En ciertas realizaciones, el puente de un resto de azúcar bicíclico es $-[C(R_a)(R_b)]_n$ -, $-[C(R_a)(R_b)]_n$ -O-, $-C(R_aR_b)-N(R)-O$ -, $-C(R_aR_b)-ON(R)$ -. En ciertas realizaciones, el puente es 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2', 4'-(CH₂)₂-O-2', 4'-CH₂-ON(R)-2', y 4'-CH₂-N(R)-O-2', en el que cada R es, independientemente, H, un grupo protector, o C_1 - C_{12} alquilo.

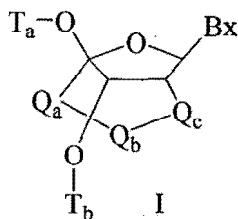
En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos que se definen adicionalmente por la configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende puente de 4 '2' metileno-oxi, puede estar en la configuración α -L o en la configuración β -D. Anteriormente, BNA de α -L-metileno-oxi (4'-CH₂-O-2') se han incorporado en oligonucleótidos antisentido que mostraban actividad antisentido (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6.365-6372).

En ciertas realizaciones, los nucleósidos bicíclicos que incluyen, pero no se limitan a, (A) α -L-metileno-oxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (b) β -D-Metileno-oxi (4'-CH₂-O-2') BNA, (C) Etileno-oxi (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA, (D) Aminooxi (4'-CH₂-O- N(R)-2') BNA, (E) Oxiamino (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA, (F) Metilo (metileno-oxi) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA, (G) metileno-otio (4'-CH₂-S-2') BNA, (H) metileno-amino (4'-CH₂-N(R)-2') BNA, (i) metilo carbocíclico (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA, y (J) propiloeno carbocíclico (4'-(CH₂)₃-2') BNA, como se representa a continuación.



en donde Bx es el resto de base y R es, independientemente, H, un grupo protector o C_1 - C_{12} alquilo.

En ciertas realizaciones, nucleósido bicíclico tiene la Fórmula I:



donde:

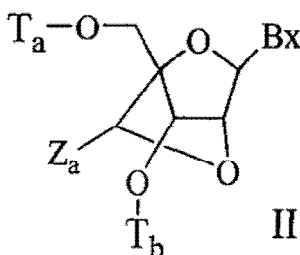
Bx es un resto de base heterocíclica;

-Q_a-Q_b-Q_c- es -CH₂-N(R_c)-CH₂-, -C(=O)-N(R_c)-CH₂-, -CH₂-ON(R_c)-, -CH₂-N(R_c)-O-, o -N(R_c)-O-CH₂;

R_c es C₁-C₁₂ alquilo o un grupo protector de amino; y

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo reactivo de fósforo, un resto fósforo, o una unión covalente a un medio de soporte.

En ciertas realizaciones, nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula II:



donde:

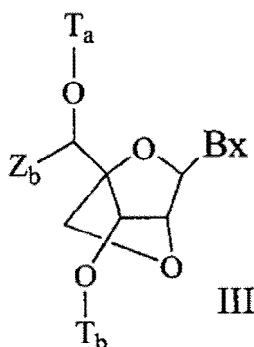
Bx es un resto de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo reactivo de fósforo, un resto fósforo, o una unión covalente a un medio de soporte;

Z_a es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tiol o tio sustituido.

En una realización, cada uno de los grupos sustituidos es, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, oxo, hidroxilo, OJ_c, NJ_cJ_d, SJ_c, N₃, OC(=X)J_c y NJ_eC(=X)NJ_cJ_d, en donde cada J_c, J_d y J_e es, independientemente, H, C₁-C₆ alquilo, o C₁-C₆ alquilo sustituido y X es O o NJ_c.

En ciertas realizaciones, nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula III:



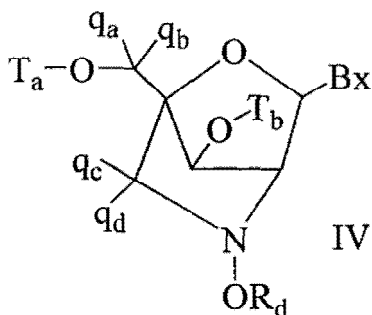
donde:

Bx es un resto de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo reactivo de fósforo, un resto fósforo, o una unión covalente a un medio de soporte;

Z_b es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo sustituido, o acilo sustituido (C(=O)-).

En ciertas realizaciones, nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula IV:



donde:

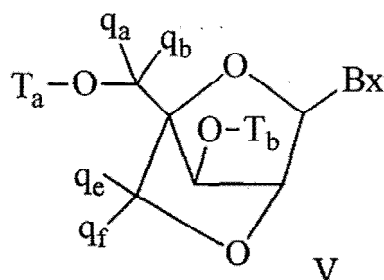
Bx es un resto de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo reactivo de fósforo, un resto fósforo, o una unión covalente a un medio de soporte;

R_d es C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo, o C₂-C₆ alquinilo sustituido;

cada q_a, q_b, q_c y q_d es, independientemente, H, halógeno, C₁-C₆ alquilo, alquilo sustituido C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquenilo sustituido, C₂-C₆ alquinilo, o C₂-C₆ alquinilo sustituido, C₁-C₆ alcoxi, sustituido C₁-C₆ alcoxi, acilo, acilo sustituido, C₁-C₆ aminoalquilo, o C₁-C₆ aminoalquilo sustituido;

En ciertas realizaciones, nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula V:



donde:

Bx es un resto de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo reactivo de fósforo, un resto fósforo, o una unión covalente a un medio de soporte;

q_a, q_b, q_c y q_d son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo, alquilo sustituido C₁-C₁₂ alquilo, C₂-C₁₂ alquenilo, C₂-C₁₂ alquenilo sustituido, C₂-C₁₂ alquinilo, C₂-C₁₂ alquinilo sustituido, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ alcoxi sustituido, OJ_i, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jK, N₃, CN, C(=O)OJ_i, C(=O)NJ_jK, C(=O)J_j, OC(=O)NJ_jK, N(H)C(=NH)NJ_jK, N(H)C(=O)NJ_jK o N(H)C(=S)NJ_jK;

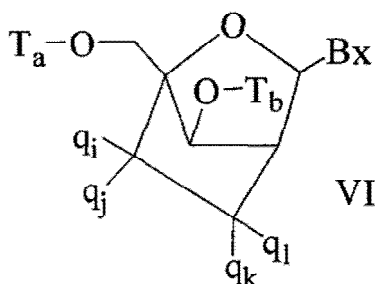
o q_c y q_d juntos son = C(q_g)(q_h);

q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo, o C₁-C₁₂ alquilo sustituido.

La síntesis y la preparación de metilenoexi (4'-CH₂-O-2') BNA monómeros adenina, citosina, guanina, 5-metilo-citosina, timina, y uracilo, juntos con su oligomerización y las propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos han sido descritos (véase, por ejemplo, Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3.607-3.630). BNAs y preparación de los mismos también se describen en WO 98/39352 y WO 99/14226.

Los análogos de metilenoexi (4'-CH₂-O-2') BNA, metilenoexi (4'-CH₂-O-2') BNA, y 2'-tio-BNA, también han sido preparados (véase, por ejemplo, Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). La preparación de análogos de nucleósidos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para las polimerasas de ácido nucleico ha sido también descrita (véase, por ejemplo, Wengel et al., WO 99/14226). Además, la síntesis de 2'-amino-BNA, un análogo de oligonucleótido de alta afinidad de novela conformacionalmente restringida, ha sido descrito en la técnica (véase, por ejemplo, Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, BNA de 2'-amino-y 2'-metiloamino se han preparado y se ha informado anteriormente de la estabilidad térmica de sus dúplex con hebras de ARN y ADN complementarias.

En ciertas realizaciones, nucleósido bicíclico que tiene la Fórmula VI:



donde:

Bx es un resto de base heterocíclica;

T_a y T_b son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado, un grupo reactivo de fósforo, un resto fósforo, o una unión covalente a un medio de soporte; cada q_i, q_j, q_k y q_l es, independientemente, H, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo, C₁-C₁₂ alquilo sustituido, C₂-C₁₂ alqueno, C₂-C₁₂ alqueno sustituido, C₂-C₁₂ alquino, C₂-C₁₂ alquino sustituido, C₁-C₁₂ alcoxi, C₁-C₁₂ alcoxi sustituido, OJ_j, SJ_j, SOJ_j, SO₂J_j, NJ_jJ_k, N₃, CN, C(=O)OJ_j, C(=O)NJ_jJ_k, C(=O)J_j, OC(=O)NJ_jJ_k, N(H)C(=NH)NJ_jJ_k, N(H)C(=O)NJ_jJ_k, o N(H)C(=S)NJ_jJ_k; y

q₁ y q_i o q_j y q_k juntos son = C (q_g) (q_h), en el que q_g y q_h son cada uno, independientemente, H, halógeno, C₁-C₁₂ alquilo, o C₁-C₁₂ alquilo sustituido.

Un nucleósido bicíclico carbocíclico que tiene un puente 4'-(CH₂)₃-2' y el análogo de alqueno, puente 4'-CH=CH-CH₂-2', han sido descritos (véase, por ejemplo, Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4429-4443 y Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731- 7740). La síntesis y la preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y estudios bioquímicos también se han descrito (véase, por ejemplo, Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc. 2007, 129 (26), 8362-8379).

Tal como se usa en este documento, "nucleósido bicíclico 4'-2'" o "nucleósido bicíclico 4' a 2'" se refiere a un nucleósido bicíclico que comprende un anillo de furanosa que comprende un puente que conecta el átomo de carbono 2' y átomo de carbono 4'.

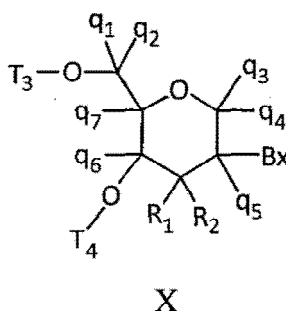
Tal como se usa en este documento, "nucleósidos monocíclicos" se refieren a nucleósidos que comprenden restos de azúcar modificados que no son restos de azúcares bicíclicos. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar, o análogo de resto de azúcar, de un nucleósido puede ser modificado o sustituido en cualquier posición.

Tal como se usa en este documento, "azúcar modificado 2'" quiere decir un azúcar de furanosilo modificado en la posición 2'. En ciertas realizaciones, tales modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados de: un haluro, incluyendo, pero no limitado a alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y sustituido, alquilo sustituido y amino no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido, y alquino sustituido y no sustituido. En ciertas realizaciones, modificaciones 2' se seleccionan de sustituyentes incluyendo, pero no limitados a: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, OCH₂C(=O)N(H)CH₃, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros grupos sustituyentes 2' también pueden seleccionarse a partir de: C₁-C₁₂ alquilo; alquilo sustituido; alqueno; alquino; alcarilo; aralquilo; O-alcarilo o O-aralquilo; SH; SCH₃; OCN; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; SOCH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; un grupo de escisión de ARN; un grupo informador; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas; y un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En ciertas realizaciones, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral de 2'-MOE (véase, por ejemplo, Baker et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 11.944-12.000). Dicha sustitución de 2'-MOE se han descrito por haber mejorado la afinidad de unión en comparación con los nucleósidos no modificados y a otros nucleósidos modificados, tales como 2'-O-metilo, O-propilo, y O-aminopropilo. Los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE también se han

demostrado ser inhibidores antisentido de la expresión de genes con características prometedoras para su uso *in vivo* (véase, por ejemplo, Martin, P., *Helv Chim Acta*, 1995, 78, 486-504.; Altmann et al, *Chimia*, 1996, 50, 168-176.; Altmann et al, *Biochem Soc Trans*, 1996, 24, 630-637; y Altmann et al, *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926).

Tal como se usa en este documento, un "nucleósido de tetrahidropirano modificado" o "nucleósido de THP modificado" significa un nucleósido que tiene un tetrahidropirano de seis miembros de "azúcar" sustituidos por el residuo pentofuranosilo en nucleósidos normales (un sustituto de azúcar). Nucleósidos de THP modificados incluyen, pero no se limitan a, lo que se conoce en la técnica como ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) (véase Leumann, CJ. *Bioorg. y Med. Chem* (2002) 10: 841-854), HNA de fluoro (F-HNA), o aquellos compuestos que tienen la Fórmula X:

Fórmula X:



en el que de forma independiente para cada uno de dicho al menos un análogo nucleosídico de tetrahidropirano de Fórmula X:

Bx es un resto de base heterocíclica;

T₃ y T₄ son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo nucleosídico de tetrahidropirano al compuesto antisentido o uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleosídico que une el análogo nucleosídico de tetrahidropirano al compuesto antisentido y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo conjugado unido o un grupo terminal 5' o 3';

q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno, independientemente, H, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquilo sustituido, C₂-C₆ alqueno, C₂-C₆ alqueno sustituido, C₂-C₆ alquino, o C₂-C₆ alquino sustituido; constituyen una de R₁ y R₂ es hidrógeno y el otro se selecciona entre halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂ y CN, en el que X es O, S, o NJ₁, y cada J₁, J₂ y J₃ es, independientemente, H o C₁-C₆ alquilo.

En ciertas realizaciones, se proporcionan los nucleósidos THP modificados de fórmula X en la que q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t y q_u son cada uno H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t y q_u es distinto de H. En ciertas realizaciones, al menos uno de q_m, q_n, q_p, q_r, q_s, q_t y q_u es metilo. En ciertas realizaciones, los nucleósidos de THP de fórmula X se proporcionan en donde uno de R₁ y R₂ es F. En algunas realizaciones, R₁ es fluoro y R₂ es H, R₁ es metoxi y R₂ es H, y R₁ es metoxietoxi y R₂ es H.

Tal como se usa en este documento, "2'-modificado" o "2'-sustituido" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2' distinta de H o OH. Nucleósidos 2'-modificados, incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos bicíclicos en los que el puente que conecta dos átomos de carbono del anillo de azúcar se conecta de carbono 2' y otro carbono del anillo de azúcar y nucleósidos con sustituyentes 2' sin puente, tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-C₁-C₁₀ alquilo, -OCF₃, O-(CH₂)₂-O-CH₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-ON(R_m)(R_n), o O-CH₂-C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H o C₁-C₁₀ alquilo sustituido o no sustituido. nucleósidos modificados 2' pueden comprender además otras modificaciones, por ejemplo, en otras posiciones del azúcar y/o en la nucleobase.

Tal como se usa en este documento, "2'-F" se refiere a un azúcar que comprende un grupo fluoro en la posición 2'.

Tal como se usa en este documento, "2'-OMe" o "2'-OCH₃" o "2'-O-metilo" cada uno se refiere a un azúcar que comprende un grupo -OCH₃ en la posición 2' del anillo de azúcar.

Tal como se usa en el presente documento, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos enlazados. En ciertas realizaciones, uno o más de la pluralidad de nucleósidos se modifica. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

Muchos otros sistemas de anillo de sustituto de azúcar bicíclico y el tricíclico también son conocidos en la técnica que se puede utilizar para modificar los nucleósidos para su incorporación en compuestos de antisentido (véase, por ejemplo, el artículo de revisión: Leumann, J. C, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854). Estos sistemas de anillo pueden someterse a diversas sustituciones adicionales para mejorar la actividad.

Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos para los expertos en la técnica.

En nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados, los restos de nucleobases (naturales, modificados, o una combinación de los mismos) se mantienen para la hibridación con una diana de ácido nucleico apropiado.

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido comprenden uno o más nucleótidos que tienen restos de azúcar modificados. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es 2'-MOE. En ciertas realizaciones, los nucleótidos 2'-MOE modificados están dispuestos en un motivo gápmero. En ciertas realizaciones, el resto de azúcar modificado es un CET. En ciertas realizaciones, los nucleótidos modificados por CET están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo gápmero.

Nucleobases modificadas

Modificaciones de nucleobase (o base) o sustituciones son estructuralmente distinguibles de, pero funcionalmente intercambiables con nucleobases naturales o sintéticas no modificadas. Tanto nucleobases naturales como modificadas son capaces de participar en enlaces de hidrógeno. Tales modificaciones de nucleobases pueden impartir estabilidad nucleasa, afinidad de unión o alguna otra propiedad biológica beneficiosa para compuestos antisentido. Las nucleobases modificadas incluyen nucleobases sintéticas y naturales tales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C). Ciertas sustituciones de nucleobases, incluyendo las sustituciones de 5-metilcitosina, son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de un compuesto antisentido para un ácido nucleico diana. Por ejemplo, las sustituciones 5-metilcitosina han demostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácido nucleico mediante 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. y Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278).

Nucleobases no modificadas adicionales incluyen citosina de 5-hidroximetilo, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, uracilo de 5-propinilo (-C≡C-CH₃) y citosina y otros derivados de alquilo de bases pirimidínicas, uracilo de 6-azo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otros adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos 5-sustituidos y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiloadenina, 2-F-adenina, 2-amino- adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina.

Restos de bases heterocíclicas también pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Las nucleobases que son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos de antisentido incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas por N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2 aminopropiloadenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

En ciertas realizaciones, los compuestos de antisentido dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B comprenden uno o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido de hueco ensanchado dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B comprenden una o más nucleobases modificadas. En ciertas realizaciones, la nucleobase modificada es 5-metilcitosina. En ciertas realizaciones, cada citosina es una 5-metilcitosina.

Composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas

Los oligonucleótidos antisentido se pueden mezclar con la sustancia activa o inerte farmacéuticamente aceptable para la preparación de composiciones farmacéuticas o formulaciones. Composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de una serie de criterios, incluyendo, pero no limitadas a la vía de administración, extensión de la enfermedad, o la dosis a administrar.

El compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de PTP1B se puede utilizar en composiciones farmacéuticas por combinación del compuesto antisentido con un diluyente farmacéuticamente aceptable o portador adecuado. Un diluyente farmacéuticamente aceptable incluye solución salina tamponada con fosfato (PBS). PBS es un diluyente adecuado para uso en composiciones para administración parenteral. Por consiguiente, en una realización, empleada en los métodos descritos en este documento es una composición farmacéutica que comprende un compuesto antisentido dirigido a un ácido nucleico de PTP1B y un diluyente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, el diluyente farmacéuticamente aceptable es PBS. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido.

Composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos de antisentido abarcan cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, o sales de tales ésteres, o cualquier otro oligonucleótido que, tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo en esto. De acuerdo con ello, por ejemplo, la divulgación también se extrae de las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sales de potasio, sodio y.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en este documento se pueden preparar por métodos bien conocidos en la técnica. Para una revisión de sales farmacéuticamente aceptables, véase Stahl y Wermuth, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use* (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002). sales de sodio de los oligonucleótidos antisentido son útiles y son bien aceptados para la administración terapéutica a los humanos. Por consiguiente, en una realización, los compuestos descritos en este documento están en la forma de una sal de sodio.

Un profármaco puede incluir la incorporación de nucleósidos adicionales en uno o ambos extremos de un compuesto antisentido que son escindidos por las nucleasas endógenas dentro del cuerpo, para formar el compuesto antisentido activo.

Compuestos de antisentido conjugados

Los compuestos de antisentido pueden ser unidos covalentemente a uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular de los oligonucleótidos antisentido resultantes. Grupos conjugados típicos incluyen restos de colesterol y restos lipídicos. grupos conjugados adicionales incluyen carbohidratos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

Los compuestos de antisentido también se pueden modificar para tener uno o más grupos estabilizadores que están generalmente unidos a uno o ambos extremos terminales de compuestos de antisentido para mejorar propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. Incluidas en grupos estabilizadores están estructuras de tapa. Estas modificaciones terminales protegen el compuesto antisentido que tiene ácido nucleico de terminales de la degradación de exonucleasa, y puede ayudar en la administración y/o localización dentro de una célula. La tapa puede estar presente en el extremo 5' (5'-tapa), o en el extremo 3' (3'-tapa), o puede estar presente en ambos extremos terminales. Estructuras de tapa se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, tapas invertidas abásicas desoxi. Además grupos estabilizantes 3' y 5' que se pueden utilizar para limitar uno o ambos extremos de un compuesto antisentido para impartir estabilidad nucleasa incluyen los descritos en el documento WO 03/004602 publicado el 16 de enero de 2003.

Cultivo de células y tratamiento de compuestos de antisentido

Los efectos de los compuestos de antisentido sobre el nivel, actividad o expresión de ácidos nucleico de PTP1B se pueden ensayar *in vitro* en una variedad de tipos de células. Tipos de células utilizadas para este tipo de análisis están disponibles de proveedores comerciales (por ejemplo, la American Type Culture Collection, Manassus, VA; Zen-Bio, Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; Clonetics Corporation, Walkersville, MD) y las células se cultivan de acuerdo con el proveedor de instrucciones usando reactivos disponibles comercialmente (por ejemplo Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Tipos celulares ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, células HepG2, células Hep3B, hepatocitos primarios, células A549, fibroblastos GM04281 y células LLC-MK2.

Pruebas in vitro de oligonucleótidos antisentido

Se describen aquí procedimientos para el tratamiento de células con oligonucleótidos antisentido, que pueden ser modificados apropiadamente para el tratamiento con otros compuestos antisentido.

En general, las células se tratan con oligonucleótidos antisentido cuando las células alcanzan aproximadamente el 60-80% de confluencia en cultivo.

Un reactivo comúnmente usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye el lípido catiónico LIPOFECTIN® reactivo de transfección (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los oligonucleótidos antisentido se mezclan con LIPOFECTIN® en OPTI-MEM® 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración final deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración de LIPOFECTIN® que varía típicamente de 2 a 12 ug/ml por 100 nM de oligonucleótido antisentido.

Otro reactivo usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye LIPOFECTAMINE 2000® (Invitrogen, Carlsbad, CA). Oligonucleótido antisentido se mezcla con LIPOFECTAMINE 2000® en OPTI-MEM® 1 medio de suero reducido (Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración

deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración LIPOFECTAMINE® que varía típicamente de 2 a 12 ug/ml por 100 nM oligonucleótido antisentido.

Otro reactivo usado para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye Cytofectin® (Invitro- gen, Carlsbad, CA). Oligonucleótido antisentido se mezcla con Cytofectin® en OPTI-MEM® 1 medio de suero reducido (Invitrogen, Carlsbad, CA) para alcanzar la concentración deseada de oligonucleótido antisentido y una concentración Cytofectin® que varía típicamente de 2 a 12 ug/ml por 100 nM oligonucleótido antisentido.

Otra técnica utilizada para introducir oligonucleótidos antisentido en células cultivadas incluye electroporación.

Las células se tratan con oligonucleótidos antisentido por métodos de rutina. Las células se recogen típicamente 16-24 horas después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido, en el que el ARN tiempo o niveles de proteína de ácidos nucleicos diana se miden por métodos conocidos en la técnica y se describen en este documento. En general, cuando los tratamientos se llevan a cabo en múltiples repeticiones, los datos se presentan como la media de los tratamientos replicados.

La concentración de oligonucleótido antisentido utilizado varía de línea celular a línea celular. Los métodos para determinar la concentración óptima de oligonucleótidos antisentido para una línea celular particular, son bien conocidos en la técnica. Oligonucleótidos antisentido se usan típicamente en concentraciones que van de 1 nM a 300 nM cuando se transfectan con LIPOFECTAMINE2000®, Lipofectina o Citofectina. Los oligonucleótidos antisentido se utilizan en concentraciones más elevadas que van desde 625 a 20.000 nM cuando se transfectaron usando electroporación.

Aislamiento de ARN

Análisis de ARN puede llevarse a cabo en el ARN celular total o poli(A)+ mARN. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El ARN se preparó utilizando métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el reactivo TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) según los protocolos recomendados por el fabricante.

Análisis de inhibición de los niveles diana o expresión

La inhibición de los niveles o la expresión de un ácido nucleico de PTP1B se puede ensayar en una variedad de formas conocidas en la técnica. Por ejemplo, niveles de ácido nucleico diana se pueden cuantificar mediante, por ejemplo, análisis de transferencia Northern, reacción de la polimerasa competitiva cadena (PCR), o PCR cuantitativa en tiempo real. El análisis de ARN puede llevarse a cabo en el ARN celular total o poli(A)+ mARN. Los métodos de aislamiento de ARN son bien conocidos en la técnica. El análisis de transferencia Northern también es rutinario en la técnica. PCR cuantitativa en tiempo real puede realizarse convenientemente usando el ABI PRISM 7600, 7700, o 7900 Sequence Detection System disponibles comercialmente, disponible en PE-Applied Biosystems, Foster City, CA y utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de ARN diana

La cuantificación de los niveles de ARN diana puede lograrse por PCR cuantitativa en tiempo real a través de ABI PRISM 7600, 7700, o 7900 Sequence Detección System (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Métodos de PCR cuantitativa en tiempo real son bien conocidos en la técnica.

Antes de la PCR en tiempo real, el ARN aislado se somete a una reacción de transcriptasa inversa (RT), que produce ADN complementario (ADNc) que se utiliza entonces como el sustrato para la amplificación por PCR en tiempo real. El RT y las reacciones de PCR en tiempo real se llevan a cabo secuencialmente en el mismo pocillo de muestra. Reactivos RT y PCR a tiempo real se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA). Reacciones de RT, PCR en tiempo real se llevan a cabo por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Cantidades diana de gen (o ARN) obtenidas por PCR en tiempo real se normalizan utilizando ya sea el nivel de expresión de un gen cuya expresión es constante, tales como la ciclofilina A, o mediante la cuantificación de ARN total usando RiboGreen® (Invitrogen, Inc. Carlsbad, CA). La expresión de Ciclofilina A se cuantifica mediante PCR en tiempo real, al ejecutarse simultáneamente con la diana, multiplexación, o por separado. El ARN total se cuantificó usando reactivo de cuantificación del ARN RIBOGREEN® (Invitrogen, Inc. Eugene, OR). Los métodos de cuantificación del ARN por RiboGreen® se enseñan en Jones, L.J., et al, (Analytical Biochemistry, 1998, 265, 368-374). Un instrumento CYTOFLUOR® 4000 (PE Applied Biosystems) se utiliza para medir la fluorescencia RiboGreen®.

Las sondas y cebadores se diseñan para hibridarse con un ácido nucleico de PTP1B. Los métodos para diseñar sondas y cebadores de PCR en tiempo real son bien conocidos en la técnica, y pueden incluir el uso de software de tipo PRIMER Express® Software (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de los niveles de proteína

La inhibición antisentido de ácidos nucleico de PTP1B se puede evaluar mediante la medición de los niveles de proteína PTP1B. Los niveles de proteína de PTP1B pueden ser evaluados o cuantificados en una variedad de maneras bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos de proteína cuantitativos, ensayos de actividad de la proteína (por ejemplo, ensayos de actividad de la caspasa), inmunohistoquímica, inmunocitoquímica o fluorescencia de células activadas (FACS). Los anticuerpos dirigidos a una diana pueden ser identificados y obtenidos a partir de una variedad de fuentes, como el catálogo MSRS de anticuerpos (Aerie Corporation, Birmingham, MI), o se pueden preparar a través de métodos monoclonales o policlonales convencionales de generación de anticuerpos bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos útiles para la detección de PTP1B humana y de rata están disponibles comercialmente.

Pruebas in vivo de los compuestos de antisentido

Los compuestos antisentido, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, son probados en animales para evaluar su capacidad para inhibir la expresión de PTP1B y producir cambios fenotípicos. Las pruebas pueden llevarse a cabo en animales normales, o en modelos de enfermedad experimentales. Para la administración a animales, los oligonucleótidos antisentido se formulan en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato. La administración incluye vías parenterales de modo de gestión. Tras un período de tratamiento con oligonucleótidos antisentido, el ARN se aísla de tejido y se miden los cambios en la expresión de ácido nucleico de PTP1B. También se midieron los cambios en los niveles de proteína PTP1B.

Ciertas indicaciones

En ciertas realizaciones, descritas en este documento son procedimientos de tratamiento de un individuo que comprenden administrar una o más composiciones farmacéuticas como se describe aquí. En ciertas realizaciones, el individuo tiene la enfermedad relacionada con el metabolismo.

Como se muestra en los ejemplos siguientes, los compuestos dirigidos a PTP1B, como se describe en el presente documento, se ha demostrado para reducir la gravedad de los síntomas fisiológicos de enfermedades relacionadas con el metabolismo, incluyendo el síndrome metabólico, diabetes mellitus, resistencia a la insulina, dislipidemia diabética, la hipertrigliceridemia, la obesidad y el aumento de peso. En algunos de los experimentos, los compuestos reducen los niveles de glucosa en sangre, por ejemplo, los animales continuaron a experimentar síntomas, pero los síntomas fueron menos graves en comparación con los animales no tratados. En otro de los experimentos, sin embargo, los compuestos parecen reducir los síntomas de la diabetes; por ejemplo, los animales tratados durante un período de tiempo más largo experimentaron síntomas menos graves que los que se administran los compuestos durante un periodo de tiempo más corto. En otro de los experimentos, sin embargo, los compuestos parecen inhibir el aumento de peso; por ejemplo, los animales tratados durante un período de tiempo más largo experimentaron síntomas menos graves que los que se administran los compuestos durante un periodo de tiempo más corto. En otro de los experimentos, sin embargo, los compuestos parecen inhibir la hipertrigliceridemia; por ejemplo, los animales tratados durante un período de tiempo más largo experimentó síntomas menos graves que los que se administran los compuestos durante un periodo de tiempo más corto. La capacidad de los compuestos ejemplificados a continuación para restaurar la función, por tanto, demuestra que los síntomas de la enfermedad pueden ser invertidos mediante el tratamiento con un compuesto tal como se describe en el presente documento.

La diabetes mellitus se caracteriza por numerosos síntomas físicos y fisiológicos. Cualquier síntoma conocido para un experto en la técnica a estar asociado con la diabetes de tipo 2 se puede mejorar o modular de otro modo como se ha expuesto anteriormente en los métodos descritos anteriormente. En ciertas realizaciones, el síntoma es un síntoma físico seleccionado del grupo que consiste en aumento de los niveles de glucosa, el aumento de la ganancia de peso, micción frecuente, sed inusual, hambre extrema, fatiga extrema, visión borrosa, infecciones frecuentes, hormigueo o entumecimiento en las extremidades, piel seca y con picazón, pérdida de peso, úlceras, inflamación de las encías y de cicatrización lenta.

En ciertas realizaciones, el síntoma es un síntoma fisiológico seleccionado del grupo que consiste en aumento de la resistencia a la insulina, aumento de los niveles de glucosa, aumento de la masa grasa, la disminución de la tasa metabólica, una disminución del aclaramiento de glucosa, disminución de la tolerancia a la glucosa, disminución de la sensibilidad a la insulina, disminución de la sensibilidad hepática a la insulina, el aumento de tamaño de tejido adiposo y el peso, aumento de grasa corporal, y el aumento de peso corporal.

En ciertas realizaciones, el síntoma físico es ganancia de peso incrementada. En ciertas realizaciones, el síntoma es la micción frecuente. En ciertas realizaciones, el síntoma es sed inusual. En ciertas realizaciones, el síntoma es hambre extrema. En ciertas realizaciones, el síntoma es la fatiga extrema. En ciertas realizaciones, el síntoma es la visión borrosa. En ciertas realizaciones, el síntoma es infecciones frecuentes. En ciertas realizaciones, el síntoma es hormigueo o entumecimiento en las extremidades. En ciertas realizaciones, el síntoma es la piel seca

y con picazón. En ciertas formas de realización, el síntoma consiste en la pérdida de peso. En ciertas realizaciones, el síntoma consiste en úlceras de cicatrización lenta. En ciertas realizaciones, el síntoma es inflamación de las encías. En ciertas realizaciones, el síntoma se incrementa la resistencia a la insulina. En ciertas realizaciones, el síntoma consiste en aumento de masa grasa. En ciertas realizaciones, el síntoma disminuye la tasa metabólica. En ciertas realizaciones, el síntoma es la disminución del aclaramiento de la glucosa. En ciertas realizaciones, el síntoma disminuye la tolerancia a la glucosa. En ciertas realizaciones, el síntoma disminuye la sensibilidad a la insulina. En ciertas realizaciones, el síntoma disminuye la sensibilidad a la insulina hepática. En ciertas realizaciones, el síntoma incrementa el tamaño de tejido adiposo y el peso. En ciertas realizaciones, el síntoma incrementa la grasa corporal. En ciertas realizaciones, el síntoma incrementa el peso corporal.

Liu y Chernoff han demostrado que PTP1B se une a y sirve como sustrato para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Liu y Chernoff, *Biochem. J.*, 1997, 327, 139-145). Además, en las células de carcinoma epidermoide humano A431, pT1b se encontró que se inactiva por la presencia de H₂O₂ generada por la adición de EGF. Estos estudios indican que PTP1B puede regularse negativamente por el estado de oxidación de la célula, que a menudo se desregula durante la tumorigénesis (Lee et al., *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 15.366-15.372).

La sobreexpresión de PTP1B se ha demostrado en cánceres de ovario malignos y esta correlación se acompañó de un aumento concomitante en la expresión del receptor del factor de crecimiento asociado (Wiener et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, 170, 1177-1183).

PTP1B se ha demostrado para suprimir la transformación en células NIH3T3 inducidas por el oncogén neu (Brown-Shimer et al., *Cancer Res.*, 1992, 52, 478-482), así como en la fibroblastos 3Y1 de rata inducidos por v-src, v-src, y v-ras (Liu et al., *Mol. Cell. Biol.*, 1998, 18, 250-259) y de fibroblastos de rata-1 inducidos por bcr-abl (LaMontagne et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1998, 95, 14.094-14.099). También se ha demostrado que PTP1B promueve la diferenciación de células K562, una línea celular de leucemia mielógena crónica, de manera similar como lo hace un inhibidor de la bcr-abl oncogénica. Estos estudios describen el posible papel de PTP1B en el control de la patogénesis de la leucemia mieloide crónica (LaMontagne et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1998, 95, 14.094-14.099).

En consecuencia, en el presente documento se divulgan métodos para mejorar un síntoma asociado con trastornos hiperproliferativos en un sujeto en necesidad del mismo. En ciertas realizaciones, el trastorno hiperproliferativo es cáncer. En ciertas realizaciones, descritos en este documento son procedimientos para mejorar un síntoma asociado con el cáncer. En ciertas realizaciones, se describe un método para reducir la tasa de aparición de un síntoma asociado con trastornos hiperproliferativos. En ciertas realizaciones, se describe un método para reducir la tasa de aparición de un síntoma asociado con el cáncer. En ciertas realizaciones, se describe un método para reducir la gravedad de un síntoma asociado con trastornos hiperproliferativos. En ciertas realizaciones, se describe un método para reducir la gravedad de un síntoma asociado con el cáncer. En tales realizaciones, los métodos comprenden administrar a un individuo en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto dirigido a un ácido nucleico de PTP1B.

En ciertas realizaciones, se describen métodos para tratar a un individuo que comprende administrar una o más composiciones farmacéuticas como se describe aquí. En ciertas realizaciones, el individuo tiene la enfermedad relacionada con el metabolismo.

En ciertas realizaciones, la administración de un compuesto antisentido dirigido a un resultado de ácido nucleico de PTP1B en la reducción de la expresión de PTP1B en al menos aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 99%, o de un rango definido por dos de estos valores.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto antisentido dirigidos a transtiretina se utilizan para la preparación de un medicamento para tratar un paciente que sufre o es susceptible de enfermedad relacionada con el metabolismo.

En ciertas realizaciones, los métodos descritos en este documento incluyen la administración de un compuesto que comprende un oligonucleótido modificado que tiene una porción de nucleobases contiguas tal como se describe en el presente documento de una secuencia indicada en SEQ ID NO: 26 (ISIS 404173).

Administración

En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones como se describe en el presente documento se pueden administrar en un número de maneras, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a ser tratada. La administración puede ser tópica, pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. Los compuestos y composiciones como se describe en el presente documento se pueden administrar directamente a un tejido u órgano.

En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones que se describen en el presente documento se administran parenteralmente. "Administración parenteral" se refiere a la administración a través de inyección o infusión. La administración parenteral incluye la administración subcutánea, administración intravenosa, administración intramuscular, administración intraarterial, administración intraperitoneal, o administración intracraneal, por ejemplo, administración intracerebral, administración intratecal, administración intraventricular, administración ventricular, la administración intracerebroventricular, administración intraventricular cerebral o la administración ventricular cerebral. La administración puede ser continua o crónica, o corta o intermitente.

En ciertas realizaciones, la administración parenteral es por inyección. La inyección puede ser administrada con una jeringa o una bomba. En ciertas realizaciones, la inyección es una inyección en bolo. En ciertas realizaciones, la inyección se administra directamente a un tejido u órgano.

En ciertas realizaciones, los compuestos y composiciones que se describen en el presente documento se administran parenteralmente.

En ciertas realizaciones, la administración parenteral es subcutánea.

En realizaciones adicionales, la formulación para la administración es los compuestos descritos en el presente documento y solución salina.

En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido se administra por inyección o infusión una vez cada mes, cada dos meses, cada 90 días, cada 3 meses, cada 6 meses, dos veces al año o una vez al año.

Ciertas terapias de combinación

En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas de la presente invención se administran conjuntamente con uno o más de otros agentes farmacéuticos. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar la misma enfermedad, trastorno, o condición como las una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar una enfermedad diferente, trastorno o condición como las una o más composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. En ciertas realizaciones, dichos uno o más agentes farmacéuticos distintos están diseñados para tratar un efecto secundario no deseado de una o más composiciones farmacéuticas como se describe aquí. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas son coadministradas con otro agente farmacéutico para tratar un efecto no deseado de ese otro agente farmacéutico. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para producir un efecto combinatorio. En ciertas realizaciones, una o más composiciones farmacéuticas se administran conjuntamente con otro agente farmacéutico para producir un efecto sinérgico.

En ciertas realizaciones, un primer agente y uno o más segundos agentes se administran al mismo tiempo. En ciertas realizaciones, el primer agente y uno o más segundos agentes se administran en momentos diferentes. En ciertas realizaciones, el primer agente y uno o más segundos agentes se preparan juntos en una única formulación farmacéutica. En ciertas realizaciones, el primer agente y uno o más segundos agentes se preparan por separado.

En ciertas realizaciones, el segundo compuesto se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones, el segundo compuesto se administra después de administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones, el segundo compuesto se administra al mismo tiempo como una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones, la dosis de un segundo compuesto coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el segundo compuesto se administra solo. En ciertas realizaciones, la dosis de un segundo compuesto coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el segundo compuesto se administra solo. En ciertas realizaciones, la dosis de un segundo compuesto coadministrado es mayor que la dosis que se administraría si el segundo compuesto se administra solo.

En ciertas realizaciones, la co-administración de un segundo compuesto potencia el efecto de un primer compuesto, tal que la co-administración de los compuestos resulta en un efecto que es mayor que el efecto de la administración del primer compuesto solo. En ciertas realizaciones, la co-administración se traduce en efectos que son aditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En ciertas realizaciones, la co-administración se traduce en efectos que son supraaditivos de los efectos de los compuestos cuando se administran solos. En ciertas realizaciones, el primer compuesto es un compuesto antisentido. En ciertas realizaciones, el segundo compuesto es un compuesto antisentido.

En ciertas realizaciones, el segundos agentes incluyen, pero no se limitan a, un agente reductor de la glucosa. El agente de reducción de la glucosa puede incluir, pero no se limita a, un cambio de estilo de vida terapéutico, agonista de PPAR, un inhibidor de peptidasa de dipeptidilo (IV), un análogo de GLP-1 analógica,

insulina o un análogo de insulina, un secretagogo de insulina, un inhibidor de SGLT2, un análogo de la amilina humana, una biguanida, un inhibidor de la alfa-glucosidasa, o una combinación de los mismos. El agente reductor de la glucosa puede incluir, pero no se limita a la metformina, sulfonilourea, rosiglitazona, meglitinida, tiazolidindiona, inhibidor de la alfa-glucosidasa o una combinación de los mismos. La sulfonilourea puede ser acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, glipizida, gliburida, o gliclazida. La meglitinida puede ser nateglinida o repaglinida. La tiazolidinediona puede ser pioglitazona o rosiglitazona. La alfa-glucosidasa puede ser acarbosa o miglitol.

En algunas realizaciones, la terapéutica hipoglucemiante es un análogo de GLP-1. En algunas realizaciones, el GLP-1 analógica es la exendina-4 o liraglutida.

En otras realizaciones, la terapéutica hipoglucemiante es una sulfonilourea. En algunas realizaciones, el sulfonilourea es acetohexamida, clorpropamida, tolbutamida, tolazamida, glimepirida, glipizida, gliburida, o gliclazida.

En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es una biguanida. En algunas realizaciones, la biguanida es metformina, y en algunas realizaciones, los niveles de glucosa en sangre se reducen sin aumento de la acidosis láctica en comparación con la acidosis láctica observada después del tratamiento con metformina sola.

En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es una meglitinida. En algunas formas de realización, la meglitinida es nateglinida o repaglinida.

En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es una tiazolidindiona. En algunas realizaciones, la tiazolidinediona es pioglitazona, rosiglitazona, o troglitazona. En algunas realizaciones, los niveles de glucosa en sangre se reducen sin mayor ganancia de peso que la observada con el tratamiento con rosiglitazona sola.

En algunas realizaciones, el fármaco hipoglucemiante es un inhibidor de la alfa-glucosidasa. En algunas realizaciones, el inhibidor de alfa-glucosidasa es la acarbosa o el miglitol.

En una cierta realización, un agente hipoglucemiante coadministrado es ISIS 113715.

En una cierta realización, la terapia hipoglucemiante es cambio de estilo de vida terapéutico.

En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes reductores de lípidos. El agente de disminución de lípidos puede incluir, pero no se limita a la atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina, y ezetimiba. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante se administra antes de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante se administra después de la administración de una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante se administra al mismo tiempo como una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es la misma que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administra solo. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante coadministrado es menor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo. En ciertas de dichas realizaciones, la dosis de un agente hipolipemiante que se coadministra es mayor que la dosis que se administraría si el agente hipolipemiante se administrara solo.

En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la reductasa de HMG-CoA. En ciertas de dichas realizaciones, el inhibidor de la reductasa de la reductasa de HMG-CoA es una estatina. En ciertas de dichas realizaciones, la estatina se selecciona de atorvastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina y rosuvastatina.

En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de la absorción de colesterol. En ciertas de dichas realizaciones, el inhibidor de la absorción de colesterol es ezetimibe.

En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de reductasa de HMG-CoA co-formulado e inhibidor de absorción de colesterol. En ciertas de dichas realizaciones, el agente hipolipemiante co-formulado es ezetimiba/simvastatina.

En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un inhibidor de proteína de transferencia de triglicérido microsomal (inhibidor de MTP).

En ciertas realizaciones, un agente hipolipemiante coadministrado es un oligonucleótido dirigido a ApoB.

En ciertas realizaciones, los segundos agentes incluyen, pero no se limitan a un fármaco o agente anti-obesidad. Tales agentes anti-obesidad incluyen, pero no se limitan a Orlistat, Sibutramina, Rimonabant o, y se pueden administrar como se ha descrito anteriormente como agentes de tejido adiposo o el peso corporal de descenso. En ciertas realizaciones, el compuesto antisentido puede ser coadministrado con supresores del apetito.

Tales inhibidores del apetito incluyen, pero no se limitan a tenuato de dietilpropión, mazindol, orlistat, fendimetrazina, fentermina, y sibutramina y se pueden administrar como se describe en el presente documento. En cierta realización, los agentes anti-obesidad se basan en CNS tales como, pero no limitados a, sibutramina o a base de GLP-1 tales como, pero no limitados a, liraglutida.

5

Formulaciones

Los compuestos proporcionados en este documento también se pueden mezclar, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas de receptores de orientación, u otras formulaciones, para ayudar en la absorción, distribución y/o absorción. Patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de tales captación, distribución y/o formulaciones de ayuda a la absorción incluyen, pero no se limitan a, US: 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

15

Los compuestos de antisentido proporcionados en el presente documento abarcan cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables, ésteres, o sales de tales ésteres, o cualquier otro compuesto que, tras la administración a un animal, incluyendo un ser humano, es capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo.

20

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos proporcionados en el presente documento: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y no confieren efectos toxicológicos no deseados al mismo. El término "sal farmacéuticamente aceptable" incluye una sal preparada a partir de ácidos o bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Para oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos 6.287.860. Las sales de sodio se han demostrado para ser formas adecuadas de fármacos de oligonucleótidos.

25

El término "derivado farmacéuticamente aceptable" abarca, pero no se limita a, sales farmacéuticamente inaceptables, solvatos, hidratos, ésteres, profármacos, polimorfos, isómeros, variantes marcadas isotópicamente de los compuestos descritos en la presente memoria.

30

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos de antisentido proporcionados en este documento. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en un número de maneras, dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a ser tratada. La administración puede ser parenteral. La administración parenteral incluye la administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o inyección intramuscular o infusión; o intracraneal, por ejemplo, administración intracerebral, administración intratecal, administración intraventricular, administración ventricular, administración intracerebroventricular, administración intraventricular cerebral o administración ventricular cerebral.

35

40

La administración parenteral, se prefiere para dirigirse a la expresión de PTP1B en el hígado y plasma. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación de 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para administración oral. Composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizaciones, líquidos y polvos. Los vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. Condones recubiertos, guantes y similares también pueden ser útiles.

45

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los ingredientes activos con el vehículo farmacéutico o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

50

55

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

60

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, soluciones, emulsiones, espumas y formulaciones que contienen liposomas. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones

65

de la presente invención pueden comprender uno o más de potenciadores de penetración, vehículos, excipientes u otros ingredientes activos o inactivos.

Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotitas por lo general superiores a 0,1 mm de diámetro. Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas y el fármaco activo que puede estar presente como una solución en la fase acuosa, la fase aceitosa o como una fase separada. Las microemulsiones se incluyen como una realización de la presente invención. Emulsiones y sus usos son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos 6.287.860.

Las formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones liposomales. Tal como se utiliza en la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa esférica o bicapas. Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que tienen una membrana formada a partir de un material lipófilo y un interior acuoso que contiene la composición a ser administrándose. Los liposomas catiónicos son liposomas que se cree que interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable con carga positiva. Los liposomas que son sensibles al pH o negativamente cargados se cree que atrapan el ADN en lugar de formarse un complejo con él. Ambos liposomas catiónicos y no catiónicos se han utilizado para suministrar ADN a las células.

Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en liposomas, dan lugar a tiempos de vida de circulación mejorada en relación con liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Los liposomas y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos 6.287.860.

En otra realización, las formulaciones de la presente invención incluyen formulaciones de solución salina. En ciertas formas de realización, una formulación consiste de los compuestos descritos en el presente documento y solución salina. En ciertas realizaciones, una formulación consiste esencialmente de los compuestos descritos en el presente documento y solución salina. En ciertas realizaciones, la solución salina es una solución salina de grado farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la solución salina es una solución salina tamponada. En ciertas realizaciones, la solución salina es una solución salina tamponada de fosfato (PBS).

En ciertas realizaciones, una formulación excluye liposomas. En ciertas realizaciones, la formulación excluye liposomas estabilizados estéricamente. En ciertas realizaciones, una formulación excluye fosfolípidos. En ciertas realizaciones, la formulación consiste esencialmente de los compuestos descritos en el presente documento y solución salina y excluye liposomas.

Las formulaciones farmacéuticas y composiciones de la presente invención también pueden incluir tensioactivos. Tensioactivos y sus usos se describen adicionalmente en la patente de Estados Unidos 6.287.860.

En una realización, la presente invención emplea varios potenciadores de la penetración para afectar a la prestación eficiente de los ácidos nucleicos, particularmente oligonucleótidos. Potenciadores de la penetración y sus usos se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. 6.287.860.

Un experto en la técnica reconocerá que las formulaciones están diseñadas de forma rutinaria de acuerdo con su uso previsto, es decir, la vía de administración.

Las formulaciones para administración tópica incluyen aquellas en las que los oligonucleótidos proporcionados en este documento están mezclados con un agente de administración tópica como por ejemplo lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Lípidos y liposomas preferidos incluyen neutro (por ejemplo, etanolamina de DOPE de dioleoilfosfatidilo, DMPC de colina de dimiristoilfosfatidilo, colina de distearoilfosfatidilo) negativo (por ejemplo, DMPG de glicerol de dimiristoilfosfatidil) y catiónico (por ejemplo, DOTAP de dioleoiltetrametilaminopropilo y DOTMA de etanolamina de dioleoilfosfatidilo).

Las composiciones y formulaciones para la administración parenteral, incluyendo intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, la inyección intramuscular intraarterial o infusión, o intracraneal pueden incluir soluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no limitado a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Ciertas realizaciones proporcionadas en este documento proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos oligoméricos y uno o más de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo no antisentido. Ejemplos de tales agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer tales como daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinósido de citosina, bis-cloroetilnitrosourea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona,

testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas nitrogenadas, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxíciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecan, topotecan, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Cuando se utiliza con los compuestos proporcionados en la presente memoria, dichos agentes quimioterapéuticos pueden usarse individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido de MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o más de otros agentes tales quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, la radioterapia y de oligonucleótidos). Los fármacos anti-inflamatorios, incluyendo pero no limitado a los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, incluyendo, pero no limitado a, ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, también pueden combinarse en composiciones proporcionadas en este documento. Las combinaciones de los compuestos de antisentido y otros fármacos no antisentido están también dentro del alcance de esta invención. Dos o más compuestos combinados pueden utilizarse juntos o secuencialmente.

En otra realización relacionada, las composiciones proporcionadas en este documento pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos de antisentido adicionales dirigidos a un segundo ácido nucleico diana. Alternativamente, las composiciones proporcionadas en este documento pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo ácido nucleico diana. Numerosos ejemplos de compuestos de antisentido se conocen en la técnica. Dos o más compuestos combinados pueden utilizarse juntos o secuencialmente.

Dosificación

Se cree que la formulación de composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) está dentro de la experiencia de aquellos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y capacidad de respuesta del estado de enfermedad a tratar, con el curso del tratamiento que dura de varios días a varios meses, o hasta que una cura se efectúa o se logra una disminución del estado de enfermedad. Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de mediciones de la acumulación de fármaco en el cuerpo del paciente. Las dosificaciones óptimas pueden variar dependiendo de la potencia relativa de oligonucleótidos individuales, y generalmente se pueden estimar sobre la base de EC_{50} que se ha encontrado para ser eficaz en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, la dosis es de 0,01 mg a 100 g por kg de peso corporal, y puede administrarse una o más veces diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente, o a intervalos deseados. Tras un tratamiento exitoso, puede ser deseable hacer que el paciente se someta a terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de enfermedad, donde el oligonucleótido se administra en dosis de mantenimiento, que van desde 0,01 mg a 100 g por kg de peso corporal, una vez o más al día.

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

Ciertos compuestos

Aproximadamente doscientos setenta y seis compuestos de antisentido de nuevo diseño de varias longitudes, motivos y composición de espina dorsal se ensayaron para determinar su efecto sobre el ARNm de PTP1B humano *in vitro* en varios tipos de células. Los nuevos compuestos se compararon con unos quinientos compuestos diseñados previamente incluyendo ISIS 107772, ISIS 107831, ISIS 142025, ISIS 142026, ISIS 142027, ISIS 142028, ISIS 142082, ISIS 146908, e ISIS 146909, que han sido previamente determinados como parte de los compuestos más potentes antisentido *in vitro* (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° de publicación de EE.UU. 2003/0220282 publicado 27.11.2003 y la publicación de patente PCT N° WO2007/131237 publicado 11/15/2007). De los aproximadamente doscientos ochenta cinco compuestos de antisentido recién diseñados y diseñados previamente, aproximadamente once compuestos se seleccionaron para estudio adicional basado en la potencia *in vitro*. Los compuestos seleccionados se ensayaron para la inhibición dependiente de la dosis en HUVEC, HepG2, HUVEC, LLC-MK2, y hepatocitos primarios cynomolgus. Oligonucleótidos adicionales se diseñaron basándose en microwalk de ISIS 409826, uno de los compuestos seleccionados que mostraron una reducción significativa de PTP1B mRNA en todas las líneas celulares ensayadas. Los oligonucleótidos se probaron en células HUVEC (Ejemplo 5), junto con gámperos de la pantalla anterior (Ejemplo 1). Se seleccionaron varios oligonucleótidos antisentido de la pantalla en el Ejemplo 5 y se ensayaron para la inhibición dependiente de la dosis en células HUVEC (Ejemplo 6) y las células HepG2 (Ejemplo 7). Además, dos oligonucleótidos fueron diseñados como shortmeros a ISIS 1.428.082, uno de los compuestos seleccionados. Estos dos shortmeros (ISIS 446431 e ISIS 446432), así como cinco oligonucleótidos ISIS seleccionados del estudio descrito en los Ejemplos 6 y 7 se probaron en células HepG2, células LLC-MK2, células HUVEC, y hepatocitos primarios cynomolgus (Ejemplos 8-11). oligonucleótidos ISIS que demostraron la reducción dependiente de la dosis de PTP1B mRNA en todas las líneas celulares se ensayaron para determinar la tolerabilidad *in vivo*. Dos oligonucleótidos más ISIS 446433 e ISIS 446434, diseñados como shortmeros para ISIS 409826, se incluyeron en los estudios de tolerancia *in vivo* también.

Los doce gámpmeros elegidos fueron probados en un modelo de ratón (véase el Ejemplo 12) y un modelo de rata (Ejemplo 13). En virtud de su secuencia complementaria, los compuestos son complementarios a las regiones 3291 a 3310, 989 a 1008, 3290 a 3309, 3.287 a 3.306, 3291 a 3310, 3288 a 3307, 3292 a 3309, 3293 a 3308, 3288 a 3305, y 3289-3304 de SEQ ID NO: 1. En los modelos *in vivo*, se midieron los pesos corporales y pesos de los órganos, los marcadores metabólicos del hígado, tales como transaminasa de alanina, transaminasa de aspartato y bilirrubina, marcadores metabólicos del riñón, tales como BUN y creatinina, niveles de glucosa en plasma, niveles de colesterol y triglicéridos, y niveles de citoquinas inflamatorias. De los doce compuestos ensayados, cinco compuestos, ISIS 142082, ISIS 404173, ISIS 410003, ISIS 446431, ISIS 446432 fueron seleccionados y se midió su viscosidad (Ejemplo 14). Todos los cinco oligonucleótidos se consideran óptimos en su viscosidad de acuerdo con los criterios establecidos para el estudio.

La evaluación final de estos estudios (Ejemplos 12-14) condujo a la selección de cuatro compuestos que tienen una secuencia de nucleobases de una secuencia indicada en SEQ ID NO: 27 (ISIS 142082), 46 (ISIS 446431), 26 (ISIS 404173), y 23 (ISIS 409826). En virtud de su secuencia complementaria, los compuestos son complementarios a las regiones 3291 a 3310, 3292 a 3309, 3290 a 3309, 3287 a 3306 de la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, los compuestos dirigidos a las regiones enumeradas, como se describe adicionalmente en el presente documento, comprenden un oligonucleótido modificado que tiene una parte de nucleobasa de la secuencia indicada en la SEQ ID NOs, como se describe adicionalmente en este documento. En ciertas realizaciones, los compuestos que se dirigen a las regiones enumeradas o que tienen una porción de nucleobasa de una secuencia indicada en las SEQ ID NOs enumeradas pueden ser de diversas longitudes, como se describe adicionalmente en este documento, y pueden tener uno de varios motivos, como se describe adicionalmente en este documento. En ciertas realizaciones, un compuesto dirigido a una región o que tiene una parte nucleobasa de una secuencia indicada en las SEQ ID NOs enumeradas tiene la longitud y el motivo específico, como se indica por ISIS NOs: ISIS 142082, ISIS 446431, ISIS 404173, e ISIS 409826.

Tres compuestos que tienen una secuencia de nucleobases de una secuencia indicada en SEQ ID NO: 27 (ISIS 142082), 23 (ISIS 404173), y 46 (ISIS 446431), se ensayaron adicionalmente en un largo plazo, estudio de tolerabilidad de seis meses en un modelo de ratón (véase el Ejemplo 15). La vida media en el hígado de ratones CD1 de los cuatro de los compuestos que tienen una secuencia de nucleobasa de una secuencia indicada en SEQ ID NOs: 53 (ISIS 409826), 27 (ISIS 142082), 26 (ISIS 404173), y 46 (ISIS 446431) también se evaluó (Ejemplo 16).

Estos cuatro compuestos se ensayaron para la eficacia, perfil farmacocinético y la tolerabilidad en monos cynomolgus (Ejemplo 17). Los estudios de inhibición en estos monos indican que el tratamiento con algunos de estos compuestos causó una reducción de PTP1B mRNA en el hígado y tejidos de grasa. Específicamente, el tratamiento con ISIS 409826, ISIS 142082, ISIS 446431 e ISIS 404173 causó una reducción de 45%, 48%, 18 y 22% de PTP1B ARNm en el tejido hepático, respectivamente comparado con el control PBS. El tratamiento con ISIS 409826, ISIS 142082, ISIS 446431 e ISIS 404173 causó una reducción de 21%, 28%, 12% y 31% de PTP1B ARNm en el tejido graso, respectivamente comparado con el control PBS. Se observó que ISIS 404173 causó una reducción similar de PTP1B mRNA en comparación con ISIS 142082, a pesar de que los dos oligonucleótidos se diferencian entre sí por un solo cambio de pares de bases de su región de destino en el SEQ ID NO: 1. Un análisis de proteínas de tejido hepático también se llevó a cabo por análisis de transferencia Western. La reducción de ARNm de PTP1B usando ISIS 409826, ISIS 142082, ISIS 446431 e ISIS 404173 se midió a una dosis máxima de 40 mgk/semana para la eficacia y a una dosis menor de 8mgk/semana para la potencia (véase tabla 45). El análisis de proteínas en una dosis menor de 8 mgk/semana demostró que ISIS 404173 causó una mayor reducción (33%) de proteína PTP1B que ISIS 142082 (20%) que demuestra que ISIS 404173 era más potente que ISIS 142082 (véase Tabla 47 y Figura 1). El análisis de proteínas en la dosis más alta de 40 mg/semana demostró que ISIS 404173 (reducción de 60% de proteína) fue tan eficaz como ISIS 142082 (65% de reducción de la proteína). Por último, el tratamiento con ISIS 409826 e ISIS 142082 resultó en niveles de PCR al 22% a 4,8 mg/L y 6,7 mg/L. Por lo tanto, ISIS 404173 causó el menor incremento en los niveles de PCR que indica que ISIS 404173 es extremadamente tolerable y no proinflamatorio. Los pesos de los órganos también se midieron para evaluar la tolerabilidad de oligonucleótidos ISIS por los monos. El tratamiento con ISIS 142082 a una dosis de 40 mg/L causó aumentos en pesos de riñón e hígado de 21 g y 18 g, respectivamente, que es un aumento de dos veces por encima del control (riñón 10 g y el hígado 10,5 g). El tratamiento con ISIS 409826 causó un aumento de dos veces en el peso del hígado (18,5 g vs. 10,5 g de control) y un incremento de tres veces en el peso del bazo (6,0 g vs. 2,3 g de control). El tratamiento con ISIS 446431 causó un aumento de cuatro veces en el peso del bazo (9,6 g vs. 2,3 g control). El tratamiento con ISIS 404173 causó un aumento de menos de una vez en todos los órganos (14,8 g riñón; hígado 15,5 g; bazo 3,7 g) Véase (Figura 2). Por lo tanto, el tratamiento con ISIS 142082, ISIS 409826 y ISIS 446431 no se consideraron tolerables en los monos, mientras que el tratamiento con ISIS 404173 era tolerable.

El tratamiento con ISIS 142082 causó aumento de peso de los órganos y niveles elevados de PCR, lo que indica un estado inflamatorio. El tratamiento con ISIS 409826 también causó niveles elevados de PCR y niveles de C3 de bajo complemento, lo que indica un estado de enfermedad. El tratamiento con ISIS 404173 e ISIS 446431 se considera óptimo en términos de sus perfiles de tolerabilidad en macacos de Java. Sin embargo, ISIS 446431 demostró menos potencia en comparación con ISIS 404173.

En el caso de los estudios de perfil farmacocinético de los oligonucleótidos en el hígado y el riñón, ninguno de los oligonucleótidos ISIS demostró proporciones anormales en la concentración en el hígado en comparación con el riñón. ISIS 404173 era un mejor acumulador renal en comparación con ISIS 142082, como se indica en los resultados.

Por lo tanto, los estudios *in vivo*, en particular en los monos cynomolgus, indican que ISIS 404173 era tan potente y considerablemente más tolerable en comparación con los otros compuestos. Los estudios demuestran que ISIS 142082, aunque desplazado de ISIS 407173 por sólo una nucleobase, era tan eficaz pero menos potente y tolerable que ISIS 404173, como se demuestra por los ensayos para marcadores metabólicos e inflamatorios. En general, ISIS 404173 era más potente y tolerable en comparación con cualquier otro compuesto.

Por consiguiente, se proporcionan en la presente memoria compuestos de antisentido con una cualquiera o más de las características mejoradas. En ciertas formas de realización, se describe en el presente documento compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado tal como se describe adicionalmente en este documento dirigido a o que se hibridan específicamente con la región de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

En consecuencia, en el presente documento se divulgan compuestos de antisentido con una cualquiera o más de las características mejoradas. En ciertas realizaciones, descritas en este documento están compuestos que comprenden un oligonucleótido modificado tal como se describe adicionalmente en este documento dirigido a o que hibrida específicamente con la región de nucleótidos de SEQ ID NO: 2.

En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento son eficaces en virtud de tener al menos uno de un CI_{50} *in vitro* de menos de 0,4 μ M, menos de 0,35 μ M, menos de 0,3 μ M, menos de 2,5 μ M, menos de 2,0 μ M, menos de 1,5 μ M, menos de 1,0 μ M, cuando se administran a una línea celular de mono cynomolgus de hepatocitos mediante electroporación como se describe en Ejemplo 11. En ciertas realizaciones, los compuestos como se describe aquí son altamente tolerables, como se demuestra por tener al menos uno de un aumento de valor de ALT o AST de no más de 4 veces, 3 veces, o 2 veces sobre los animales tratados con solución salina; o un aumento en el hígado, el bazo o el peso del riñón de no más de 30%, 20%, 15%, 12%, 10%, 5% o 2%.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Inhibición antisentido del ARNm de PTP1B humano en células HUVEC

Los oligonucleótidos antisentido dirigidos a un ácido nucleico de PTP1B humano fueron diseñados y examinados por su efecto sobre la transcripción ARN PTP1B *in vitro*. ISIS 107772, ISIS 107831, ISIS 142025, ISIS 142026, ISIS 142027, ISIS 142028, ISIS 142082, ISIS 146908, e ISIS 146909, reivindicada en una patente anterior (BIOL001USP2) fueron incluidos en este ensayo para la comparación. Las células HUVEC se cultivaron a una densidad de 5.000 células por pocillo se transfectaron usando LipofectAMINE 2000® con 2 nM de oligonucleótido antisentido. Después de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real. Los niveles de PTP1B de ARNm se ajustaron de acuerdo con el contenido total de ARN, medido por RiboGreen®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de los niveles de PTP1B de ARNm, en relación con células de control no tratadas.

Los oligonucleótidos antisentido de la Tabla 1 son 5-10-5 gápmeros MOE o 2-13-5 gápmeros MOE. Los 5-10-5 gápmeros MOE tienen un segmento de hueco que comprende diez 2'-deoxinucleósidos y segmento de dos alas que comprende cinco nucleósidos de 2'-MOE. Los 2-13-5 gápmeros MOE tienen un segmento de hueco que comprende trece 2'-deoxinucleósidos, un segmento de ala 5' que comprende dos nucleósidos de 2'-MOE y un segmento de ala 3' que comprende tres nucleósidos de 2'-MOE. Los enlaces de internucleósido largo de cada gápmero son enlaces de fosforotioato (P=S). Todos los residuos de citosina a través de cada gápmero son 5-metilcitosinas. 'Sitio de inicio de diana' indica el extremo nucleótido más 5' al que el oligonucleótido antisentido está dirigido en la secuencia del gen humano. 'Sitio de parada de diana' indica el nucleótido más 3' al que el oligonucleótido antisentido está dirigido en la secuencia del gen humano. Todos los oligonucleótidos antisentido enumerados en la Tabla 1 se dirigen, ya sea a la secuencia de ARNm, designada aquí como SEQ ID NO: 1 (Nº de Acceso GenBank NM_002827.2) o a la secuencia genómica, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 2 (Nº de acceso de NT_011362.9 truncado de los nucleótidos 14178000 a 14256000), o a ambas.

Algunos de los oligonucleótidos humanos de la Tabla 1 son también totalmente de reacción cruzada con las secuencias de gen de mono rhesus. 'n/a' indica que había más de 3 apareamientos erróneos de bases entre el oligonucleótido humano y la secuencia del gen de mono rhesus. Cuanto mayor sea la complementariedad entre el oligonucleótido humano y la secuencia de mono rhesus, más probable el oligonucleótido humano puede reaccionar de forma cruzada con la secuencia de mono rhesus. Los oligonucleótidos humanos en la Tabla 1 se compararon con la SEQ ID NO: 3 (exones 1-9, intrón 9 y exón 10 del andamio PTP1B de mono rhesus). "Sitio de inicio de diana de mono rhesus" indica el extremo más 5' de nucleótidos al que el gápmero está dirigido en la secuencia del gen de mono rhesus. "Sitio de parada de diana de mono rhesus" indica el nucleótido más 3' al que el gápmero está dirigido en la secuencia del gen de mono rhesus.

Tabla 1

La inhibición de la transcripción de ARN PTP1B humano en células HUVEC mediante oligonucleótidos antisentido dirigidos a la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3

ISIS No	Secuencia	Motivo	% de inhibición	Sitio de inicio de SEQ ID NO: 1	Sitio de inicio de SEQ ID NO: 2	Sitio de inicio de SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO
142025	TTGTCGATCTGCTCGAACTC	5-10-5	43	190	1989	197	4
142026	GACTTGTCGATCTGCTCGAA	5-10-5	59	193	1992	989	5
107772	CCCGGACTTGTCGATCTGCT	5-10-5	66	197	1996	3754	6
142027	GCTCCCGGACTTGTCGATCT	5-10-5	55	200	1999	3759	7
142028	CCAGCTCCCGGACTTGTCGA	5-10-5	60	203	2002	4498	8
373125	GGCACCTTCGATCACAGCCA	5-10-5	55	989	70726	4487	9
113715	GTCCTTCCACTGATCCTGC	5-10-5	50	1035	n/a	4500	10
107831	GGTCATGCACAGGCAGGTTG	5-10-5	70	2360	75039	3753	11
409988	AGGTCATGCACAGGCAGGTT	2-13-5	83	2361	75040	3759	12
409821	GATCAGGTCATGCACAGGCA	5-10-5	86	2365	75044	3575	13
404176	TGATCAGGTCATGCACAGGC	5-10-5	87	2366	75045	4493	14
146908	ACCCTTGGAATGTCTGAGTT	5-10-5	56	2544	75223	3746	15
404169	CCCATACCCTTGGAATGTCT	5-10-5	77	2549	75228	3756	16
409815	TCCCATACCCTTGGAATGTC	5-10-5	72	2550	75229	3566	17
146909	TTCCCATACCCTTGGAATGT	5-10-5	43	2551	75230	3569	18
409845	TATTCCATGGCCATTGTAAA	5-10-5	23	3283	75962	4485	19
410030	TTATTCCATGGCCATTGTAA	2-13-5	24	3284	75963	4486	20
409825	TTTATTCCATGGCCATTGTA	5-10-5	34	3285	75964	192	21
409883	GTTTATTCCATGGCCATTGT	3-14-3	36	3286	75965	198	22
409999	GGTTTATTCCATGGCCATTG	2-13-5	54	3287	75966	190	23
409826	GGTTTATTCCATGGCCATTG	5-10-5	73	3287	75966	201	23
410000	TGGTTTATTCCATGGCCATT	2-13-5	55	3288	75967	194	24
404172	TGGTTTATTCCATGGCCATT	5-10-5	61	3288	75967	192	24
410001	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	2-13-5	51	3289	75968	198	25
409827	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	5-10-5	44	3289	75968	195	25
410002	AATGGTTTATTCCATGGCCA	2-13-5	0	3290	75969	204	26
404173	AATGGTTTATTCCATGGCCA	5-10-5	48	3290	75969	201	26
410003	AAATGGTTTATTCCATGGCC	2-13-5	64	3291	75970	193	27
142082	AAATGGTTTATTCCATGGCC	5-10-5	52	3291	75970	190	27
410004	AAAAATGGTTTATTCCATGGC	2-13-5	46	3292	75971	196	28
409828	AAAAATGGTTTATTCCATGGC	5-10-5	44	3292	75971	194	28
409829	AAAAATGGTTTATTCCATGG	5-10-5	36	3293	75972	198	29
404161	GGTCATTTCCATGGCCAGAG	2-13-5	78	n/a	73855	3746	31
409975	GGAGGTCATTTCCATGGCCA	2-13-5	85	n/a	73858	n/a	32
409976	AGGAGGTCATTTCCATGGCC	2-13-5	85	n/a	73859	2379	30

Ejemplo 2: Inhibición antisentido dependiente de dosis del ARNm de PTP1B humano en células HUVEC

Varios oligonucleótidos antisentido, que mostraron la inhibición antisentido significativa de PTP1B mRNA en el estudio descrito en el Ejemplo 1 se ensayaron adicionalmente en células HUVEC en diversas dosis. Las células se sembraron a una densidad de 5.000 células por pocillo y se transfectaron usando LipofectAMINE 2000® con 0,9375 nM, 1,875 nM, 3,75 nM, 7,5 nM, 15 nM, y 30 concentraciones nM de cada oligonucleótido antisentido. Después de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de transcripción de ARNm de PTP1B se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de sonda de cebadores RTS3000 (secuencia hacia delante CTGGTTTAACCTCCTATCCTTGA, designada aquí como SEQ ID NO: 33; secuencia inversa CAGAGCAGCTCGCTACCTCTCT, designada en el presente documento como SEQ ID NO: 34, secuencia de la sonda CAGCTGGCTCTCCACCTTGTTACACATTATGT, designada aquí como SEQ ID NO: 35). los niveles de PTP1B de mRNA se normalizaron al contenido de ARN total, medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en la Tabla 2 como porcentaje de inhibición de PTP1B mRNA, respecto a las células de control sin tratar.

Tabla 2

Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B humano en células HUVEC							
ISIS No	0,9375 nM	1,875 nM	3,75 nM	7,5 nM	15,0 nM	30,0 nM	Cl ₅₀ (nM)
113715	0	0	2	11	23	33	> 30
404161	1	0	7	29	42	57	17
404169	0	6	17	37	57	72	7
404176	0	0	20	38	68	79	6
409815	0	0	7	30	48	65	12
409821	0	1	17	41	68	82	5
409826	0	0	10	30	47	64	12
409975	0	0	23	50	74	86	4
409976	0	0	21	46	65	82	5
409988	0	0	23	49	70	83	5
410003	0	0	4	16	28	46	> 30

Ejemplo 3: inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B mRNA en células LLC-MK2

Los oligonucleótidos antisentido del estudio descrito en el Ejemplo 2 también son de reacción cruzada con el secuencia del gen de mono rhesus (SEQ ID NO: 3) y se ensayaron adicionalmente en células LLC-MK2 de mono rhesus a diversas dosis. Las células se sembraron a una densidad de 3.000 células por pocillo y se transfectaron usando Lipofectina con 3,125 nM, 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, y 100 nM concentraciones de cada oligonucleótido antisentido. Después de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de cebadores de sonda RTS198 (secuencia delantera GGAGTTCGAGCAGATCGACAA, designada aquí como SEQ ID NO: 36; secuencia inversa GGCCACTCTACATGGGAAGTC, designada aquí como SEQ ID NO: 37, secuencia de sonda AGCTGGGCGGCCATTTACCAGGAT, designada aquí como SEQ ID NO: 38). Los niveles de PTP1B de mRNA se normalizaron al contenido de ARN total, medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en la Tabla 3 como porcentaje de inhibición de PTP1B mRNA, respecto a las células de control sin tratar. Los sitios de inicio y parada de cada oligonucleótido en mono rhesus SEQ ID NO: 3 (la concatenación de los exones 1-9, intrón 9 y exón 10 del andamio PTP1B rhesus (andamio de gen 240) se presentan en la Tabla 4.

Tabla 3

inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B mRNA en células LLC-MK2							
ISIS No	3,125 nM	6,25 nM	12,5 nM	25,0 nM	50,0 nM	100,0 nM	Cl ₅₀ (nM)
113715	9	18	18	42	71	88	12
404161	18	26	37	49	67	79	9
404169	9	33	36	52	70	85	8
404176	4	21	28	52	73	85	10
409815	19	27	32	51	67	83	9
409821	4	20	37	53	74	85	9
409826	7	31	63	46	62	78	8
409975	13	20	28	43	62	74	15
409976	12	20	37	42	65	77	12
409988	3	20	39	56	73	86	8
410003	16	24	36	43	65	80	11

Tabla 4

Sitios diana de oligonucleótidos antisentido dirigidos a PTP1B en la secuencia del gen de mono rhesus (SEQ ID NO: 3)		
ISIS No	Sitio de inicio	Sitio de parada
113715	1035	1054
404161	2385	2404
409975	2388	2407
409976	2389	2408
409988	3566	3585
409821	3570	3589
404176	3571	3590
404169	3754	3773
409815	3755	3774
409826	4491	4510
410003	4495	4514

Ejemplo 4: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B mRNA en hepatocitos primarios cynomolgus

Algunos de los oligonucleótidos antisentido del estudio descrito en los Ejemplos 1, 2 y 3 se ensayaron adicionalmente en hepatocitos primarios cynomolgus a diversas dosis. Las células se sembraron a una densidad de 35.000 células por pocillo y se transfectaron usando Lipofectina con 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, y 200 nM concentraciones de cada antisentido oligonucleótido. Después de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de cebadores de sonda RTS198. los niveles de PTP1B de mRNA se normalizaron al contenido de ARN total, medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en la Tabla 5 como porcentaje de inhibición de PTP1B mRNA, respecto a las células de control sin tratar.

Tabla 5

Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B mRNA en hepatocitos primarios cynomolgus							
ISIS No	6,25 nM	12,5 nM	25,0 nM	50,0 nM	100,0 nM	200,0 nM	CI ₅₀ (nM)
373125	16	4	13	32	48	67	104
404161	7	3	24	40	56	77	72
404169	0	13	27	44	57	77	67
404176	16	17	27	42	64	76	59
409815	0	24	26	40	57	75	69
409821	0	9	25	37	60	73	73
409826	8	28	10	37	56	71	82
409975	13	19	29	38	57	75	67
409976	2	18	13	35	60	80	70
409988	16	22	28	41	59	77	61
410003	17	10	37	46	60	78	56

Ejemplo 5: Inhibición antisentido del ARNm de PTP1B humano en células HUVEC mediante oligonucleótidos diseñados por microwalk

Gápmers adicionales fueron diseñados sobre la base de ISIS 409826 que demostró una inhibición significativa de PTP1B en todas las líneas celulares ensayadas. Estos gápmers fueron diseñados mediante la creación de gápmers que se desplazan ligeramente aguas arriba y aguas abajo (es decir, "microwalk") de ISIS 409826. Los oligonucleótidos también se crearon con diversos motivos, por ejemplo, motivos 5-10-5 MOE, 5-8-5 MOE, 2-13-5 Moe, 6-8-6 MOE, o fueron oligonucleótidos uniformes con desoxi y unidades de MOE. Estos gápmers se examinaron *in vitro*. Oligonucleótidos ISIS 142082, ISIS 113715, ISIS 373125, ISIS 404161, ISIS 404172, ISIS 404173, ISIS 404176, ISIS 409825, ISIS 409827, ISIS 409828, ISIS 409829, ISIS 409845, ISIS 409998, ISIS 409999, ISIS 410000, ISIS 410001, ISIS 410002, ISIS 410003, ISIS 410004, e ISIS 410030 (del Ejemplo 1), así como ISIS 399038, ISIS 404159, ISIS 404174 y, a partir de una solicitud anterior (CORE0061WO15), también se incluyeron en el ensayo para la comparación. Las células HUVEC se cultivaron a una densidad de 20.000 células por pocillo se transfectaron usando electroporación con 2,000 nM de oligonucleótido antisentido. Después de un

período de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real. El conjunto de cebador de sonda humano establecido RTS3000 se utilizó para medir los niveles de PTP1B de ARNm. los niveles de PTP1B de ARNm se ajustaron de acuerdo con el contenido total de ARN, medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de PTP1B mARN, respecto a las células de control sin tratar. Los resultados se presentan en las Tablas 6 y 7.

Los 5-10-5 gápmers MOE son de 20 nucleótidos de longitud, en los que el segmento central hueco está compuesto de diez 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden cinco nucleótidos cada una. Los 5-8-5 gápmers MOE son 18 nucleótidos de longitud, en los que el segmento central hueco se compone de ocho 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas de cinco nucleótidos que comprenden. Los 2-13-5 gápmers MOE son de 20 nucleótidos de longitud, en los que el segmento central hueco se compone de trece 2'-desoxinucleótidos y está flanqueado en las direcciones 5' y 3' con las alas que comprenden dos y cinco nucleótidos respectivamente. Los 6-8-6 gápmers MOE son 18 nucleótidos de longitud, en los que el segmento central hueco se compone de ocho 2'-desoxinucleótidos está flanqueado en ambos lados (en las direcciones 5' y 3') por alas que comprenden seis nucleótidos. Para cada uno de los motivos (5-10-5, 5-8-5, 2-13-5 y 6-8-6), cada nucleótido en el extremo 5' del segmento del ala y cada nucleótido en el extremo 3' del segmento de ala tiene una modificación de 2'-MOE. Los oligonucleótidos uniformes tienen unidades de desoxi y Moe distribuidos a lo largo de la longitud del oligonucleótido. Los símbolos para las diversas químicas de unidades en las secuencias de oligonucleótidos uniformes son como sigue: 'd' = 2'-desoxirribosa; 'e' = 2'-O-metoxietilo ribosa. Los enlaces de internucleósido a lo largo de cada gápmers son enlaces de fosforotioato (P =S). Todos los residuos de citidina a lo largo de cada gápmers son 5-metilcitidinas. "Sitio de inicio de destino" indica nucleótidos más 5' de los que está dirigido el gápmers. "Sitio de parada de diana" indica el nucleótido más 3' al que está dirigido el gápmers. Cada gápmers enumerado en la Tabla 6 se dirige a SEQ ID NO: 1 (Nº de Acceso GenBank NM_002827.2). Todos los oligonucleótidos antisentido enumerados en la Tabla 7 objetivo SEQ ID NO: 2 (Nº de acceso de NT_011362.9 truncadas de los nucleótidos 14178000 a 14256000).

Como se muestra en las Tablas 6 y 7, varios de los gápmers exhibieron una inhibición de al menos el 50%, incluidos los números de ISIS: 113715, 142082, 373125, 399038, 404159, 404161, 404172, 404173, 404176, 409826, 409827, 409999, 410000, 410001, 410002, 410003, 410004, 438371, 438372, 438373, 438374, 438375, 438377, 438379, 438380, 438381, 438383, 438384, 438439, 438442, 438443, 438444, 438445, 438450, 438451, 438452, 438453, 438454, 438456, 438458, 438459, 438460, 438461, 438462, 438464, 438465, 438468, 438469, 438472, 438473, y 438474.

Varios de los gápmers exhibieron una inhibición de al menos 60%, incluidos los números de ISIS: 113715, 142082, 373125, 404161, 404172, 404173, 404176, 409826, 409827, 409999, 410000, 410001, 410002, 410003, 438373, 438380, 438381, 438382, 438442, 438444, 438445, 438450, 438451, 438452, 438453, 438459, 438460, 438461, 438462, 438468, 438469, 438472, y 438474.

Varios de los gápmers exhibieron inhibición de al menos 70%, incluyendo los números ISIS: 142082, 373125, 399038, 404172, 404173, 404176, 409826, 409827, 409999, 410000, 410001, 410002, 410003, 438373, 438374, 438451, 438452, 438453, 438460, 438461, 438462, 438468, 438469, 438472, y 438474.

Varios de los gápmers exhibieron inhibición de al menos 80%, incluyendo los números ISIS: 142082, 404161, 404173, 409826, 410000, 410001, 410002, 410003, 438451, 438452, 438460, 438461, y 438474.

Varios de los gápmers exhibieron una inhibición de al menos el 85%, incluidos los números de ISIS: 142082, 404161, 404173, 409826, 410001, 410002, y 410003.

Varios de los gápmers exhibieron inhibición de al menos 90%, incluyendo los números ISIS: 142.082, 404.161, y 409.826.

Tabla 6

Inhibición de los niveles de PTP1B de ARNm humano por los oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigidos a la SEQ ID NO: 1

Sitio de inicio	Sitio de parada	ISIS No	Secuencia	Motivo	% de inhibición	SEQ ID NO
989	1008	373125	GGCACCTTCGATCACAGCCA	5-10-5 MOE	72	9
1035	1054	113715	GCTCCTTCCACTGATCCTGC	5-10-5 MOE	68	10
2366	2385	404176	TGATCAGGTCATGCACAGGC	5-10-5 MOE	89	14
3283	3302	409845	TATTCCATGGCCATTGTAAA	5-10-5 MOE	32	19
3284	3303	404174	TTATTCCATGGCCATTGTAA	5-10-5 MOE	47	20

328 4	330 3	4100 30	TTATTCCATGGCCATTGTAA	2-13-5 MOE	47	20
328 4	330 3	4383 77	T _e T _e A _d T _d T _d C _e C _e A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _d T _d A _e A _e	Unidades desoxi y MOE	52	20
328 4	330 3	4384 39	T _e T _e A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _e G _e C _d C _d A _d T _d G _d T _d T _d A _e A _e	Unidades desoxi y MOE	53	20
328 4	330 3	4384 48	T _e T _e A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d G _d T _d A _e A _e	Unidades desoxi y MOE	34	20
328 4	330 3	4384 57	T _e T _e A _e T _d T _d C _d C _d A _e T _d G _d G _d T _e C _d C _d A _d T _d G _d T _d A _e A _e	Unidades desoxi y MOE	35	20
328 4	330 3	4384 66	TTATTCCATGGCCATTGTAA	6-8-6 MOE	25	20
328 5	330 4	4098 25	TTTATTCCATGGCCATTGTA	5-10-5 MOE	47	21
328 5	330 4	4099 98	TTTATTCCATGGCCATTGTA	2-13-5 MOE	49	21
328 5	330 2	4383 68	TATTCCATGGCCATTGTA	5-8-5 MOE	32	39
328 5	330 4	4383 78	TeTeTdAdTdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTdAe Ae	Unidades desoxi y MOE	46	21
328 5	330 4	4384 40	TeTeTdAdTdTdCdCdAdTdGeGdCdCdAdTdTdG dTdAe	Unidades desoxi y MOE	30	21
328 5	330 4	4384 49	TeTeTdAdTdTeCeCdAdTdGdGdCdCdAdTdTdG eTdAe	Unidades desoxi y MOE	43	21
328 5	330 4	4384 58	TeTeTdAdTdTdCdCeAeTdGdGdCdCdAdTdTdG eTdAe	Unidades desoxi y MOE	53	21
328 5	330 4	4384 67	TTTATTCCATGGCCATTGTA	6-8-6 MOE	33	21
328 6	330 5	3990 38	GTTTATTCCATGGCCATTGT	5-10-5 MOE	74	22
328 6	330 5	4041 59	GTTTATTCCATGGCCATTGT	2-13-5 MOE	54	22
328 6	330 3	4383 69	TTATTCCATGGCCATTGT	5-8-5 MOE	33	40
328 6	330 5	4383 79	GeTdTdTdAdTeTeCdCdAdTreGdGdCdCdAdTdT dGeTd	Unidades desoxi y MOE	51	22
328 6	330 5	4384 41	GeTdTdTdAdTdTdCdCdAeTdGdGdCdCdAdTdT dGeTd	Unidades desoxi y MOE	40	22
328 6	330 5	4384 50	GeTeTeTreAdTeTeCdCdAdTreGdGdCdCdAdTre TdGeTd	Unidades desoxi y MOE	64	22
328 6	330 5	4384 59	GeTeTeTreAdTdTdCdCdAdTreGdGdCdCdAdTre TdGeTd	Unidades desoxi y MOE	68	22
328 6	330 5	4384 68	GTTTATTCCATGGCCATTGT	6-8-6 MOE	76	22
328 7	330 6	4098 26	GGTTTATTCCATGGCCATTG	5-10-5 MOE	93	23

328 7	330 6	4099 99	GGTTTATTCCATGGCCATTG	2-13-5 MOE	75	23
328 7	330 4	4383 70	TTTATTCCATGGCCATTG	5-8-5 MOE	33	41
328 7	330 6	4383 80	GeGeTdTdAdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTeGe	Unidades desoxi y MOE	63	23
328 7	330 6	4384 42	GeGeTdTdAdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTeGe	Unidades desoxi y MOE	67	23
328 7	330 6	4384 51	GeGeTdTdAdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTeGe	Unidades desoxi y MOE	83	23
328 7	330 6	4384 60	GeGeTdTdAdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTeGe	Unidades desoxi y MOE	82	23
328 7	330 6	4384 69	GGTTTATTCCATGGCCATTG	6-8-6 MOE	71	23
328 8	330 7	4041 72	TGGTTTATTCCATGGCCATT	5-10-5 MOE	76	24
328 8	330 7	4100 00	TGGTTTATTCCATGGCCATT	2-13-5 MOE	83	24
328 8	330 5	4383 71	GTTTATTCCATGGCCATT	5-8-5 MOE	54	42
328 8	330 7	4383 81	TdGeGdTdTdAdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTeTe	Unidades desoxi y MOE	69	24
328 8	330 7	4384 43	TdGeGdTdTdAdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTeTe	Unidades desoxi y MOE	50	24
328 8	330 7	4384 52	TdGeGeTdTdTdAdTdCdCdAdTreGdGdCdCdAdTeTe	Unidades desoxi y MOE	82	24
328 8	330 7	4384 61	TdGeGeTdTdTdAdTeTeCdCdAdTdGdGdCdCdCdAdTeTe	Unidades desoxi y MOE	81	24
328 8	330 7	4384 70	TGGTTTATTCCATGGCCATT	6-8-6 MOE	46	24
328 9	330 8	4098 27	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	5-10-5 MOE	74	25
328 9	330 8	4100 01	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	2-13-5 MOE	85	25
328 9	330 6	4383 72	GGTTTATTCCATGGCCAT	5-8-5 MOE	52	43
328 9	330 8	4383 82	AeTdGdGdTdTeTeAdTdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTd	Unidades desoxi y MOE	65	25
328 9	330 8	4384 44	AeTdGdGdTdTdTdAdTdTeCeCdAdTdGdGdCdCdAdTd	Unidades desoxi y MOE	72	25
328 9	330 8	4384 53	AeTdGeGdTreTeTeAdTdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTe	Unidades desoxi y MOE	72	25

3289	3308	438462	AeTdGeGdTdTdTreAeTdTreCdCdAdTreGdGddor eCdAeTd	Unidades desoxi MOE	y70	25
3289	3308	438471	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	6-8-6 MOE	45	25
3290	3309	404173	AATGGTTTATTCCATGGCCA	5-10-5 MOE	85	26
3290	3309	410002	AATGGTTTATTCCATGGCCA	2-13-5 MOE	85	26
3290	3307	438373	TGGTTTATTCCATGGCCA	5-8-5 MOE	70	44
3290	3309	438383	AeAeTreGdGdT _e TeTreA _d T _d C _d C _d A _d TreG _d G _d C _d C _e A _e e	Unidades desoxi MOE	y54	26
3290	3309	438445	AeAeTdGdGdTdTdAdTeTeCdCdAdTdGdGdCd CdAe	Unidades desoxi MOE	y66	26
3290	3309	438454	AeAeTdGdGdTeTeTdAdTdTdCdCdAdTdGdGdCd CdAe	Unidades desoxi MOE	y52	26
3290	3309	438463	AeAeTdGdGdTdTdTdAeTdTdCdCdAdTdGdGdCd CdAe	Unidades desoxi MOE	y39	26
3290	3309	438472	AATGGTTTATTCCATGGCCA	6-8-6 MOE	73	26
3291	3310	142082	AAATGGTTTATTCCATGGCC	5-10-5 MOE	90	27
3291	3310	410003	AAATGGTTTATTCCATGGCC	2-13-5 MOE	86	27
3291	3308	438374	ATGGTTTATTCCATGGCC	5-8-5 MOE	79	45
3291	3310	438384	AeAeAdTdGdGeTdTdTdAdTdTdCdCdAdTdGdGd CdCd	Unidades desoxi MOE	y53	27
3291	3310	438446	AeAeAdTdGdGdTdTdTdAeTdTdCdCdAdTdGdGd CdCd	Unidades desoxi MOE	y38	27
3291	3310	438455	AeAeAeTdGdGeTdTdTdAdTdTdCdCdAdTdGdGe CdCd	Unidades desoxi MOE	y58	27
3291	3310	438464	AeAeAeTdGdGdTdTeTeAdTdTdCdCdAdTdGdGd CdCd	Unidades desoxi MOE	y58	27
3291	3310	438473	AAATGGTTTATTCCATGGCC	6-8-6 MOE	57	27
3292	3311	409828	AAAATGGTTTATTCCATGGC	5-10-5 MOE	43	28
3292	3311	410004	AAAATGGTTTATTCCATGGC	2-13-5 MOE	58	28
3292	3309	438375	AATGGTTTATTCCATGGC	5-8-5 MOE	55	46
3292	3311	438385	AeAeAdAdTdGeGeTdTdTdAdTdTdCdCdAdTdGd GeCd	Unidades desoxi MOE	y36	28
3292	3311	438447	AeAeAdAdTdGdGdTdTdTdAeTdTdCdCdAdTdGd GeCd	Unidades desoxi MOE	y35	28
3292	3311	438456	AeAeAeAdTdGeGeTdTdTdAdTdTdCdCdAdTdGe GeCd	Unidades desoxi MOE	y58	28
3292	3311	438465	AeAeAeAdTdGdGTeTeTdAdTdTdCdCdAdTdGeG eCd	Unidades desoxi MOE	y51	28
3292	3311	438474	AAAATGGTTTATTCCATGGC	6-8-6 MOE	82	28
3293	3312	409829	AAAAATGGTTTATTCCATGG	5-10-5 MOE	42	29
3293	3310	438376	AAATGGTTTATTCCATGG	5-8-5 MOE	36	47

Tabla 7

La inhibición de los niveles de PTP1B de ARNm humano por los oligonucleótidos antisentido quiméricos dirigido a la SEQ ID NO: 2

Sitio de inicio	Sitio de parada	ISIS No	Secuencia	Motivo	% inhibición	de SEQ ID NO
70726	70745	373125	GGCACCTTCGATCACAGCCA	5-10-5 MOE	72	9
73855	73874	404161	GGTCATTTCCATGGCCAGAG	2-13-5 MOE	93	31
75045	75064	404176	TGATCAGGTCATGCACAGGC	5-10-5 MOE	89	14
75962	75981	409845	TATTCCATGGCCATTGTAAA	5-10-5 MOE	32	19
75963	75982	404174	TTATTCCATGGCCATTGTAA	5-10-5 MOE	47	20
75963	75982	410030	TTATTCCATGGCCATTGTAA	2-13-5 MOE	47	20
75963	75982	438377	TeTeAdTdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTdGdTdAeAe	Unidades desoxi MOE y	52	20
75963	75982	438439	TeTeAdTdTdCdCdAdTdGeGeCdCdAdTdTdGdTdAeAe	Unidades desoxi MOE y	53	20
75963	75982	438448	TeTeAeTdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTdGdTdAeAe	Unidades desoxi MOE y	34	20
75963	75982	438457	TeTeAeTdTdCdCdAeTdGdGdCdCdAdTdTdGdTdAeAe	Unidades desoxi MOE y	35	20
75963	75982	438466	TTATTCCATGGCCATTGTAA	6-8-6 MOE	25	20
75964	75983	409825	TTTATTCCATGGCCATTGTA	5-10-5 MOE	47	21
75964	75983	409998	TTTATTCCATGGCCATTGTA	2-13-5 MOE	49	21
75964	75981	438368	TATTCCATGGCCATTGTA	5-8-5 MOE	32	39
75964	75983	438378	TeTeTdAdTdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTdGdTdAe	Unidades desoxi MOE y	46	21
75964	75983	438440	TeTeTdAdTdTdCdCdAdTdGeGdCdCdAdTdTdGdTdAe	Unidades desoxi MOE y	30	21
75964	75983	438449	TeTeTdAdTdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTdGeTdAe	Unidades desoxi MOE y	43	21
75964	75983	438458	TeTeTdAdTdTdCdCdAeTdGdGdCdCdAdTdTdGeTdAe	Unidades desoxi MOE y	53	21
75964	75983	438467	TTTATTCCATGGCCATTGTA	6-8-6 MOE	33	21
75965	75984	399038	GTTTATTCCATGGCCATTGT	5-10-5 MOE	74	22
75965	75984	404159	GTTTATTCCATGGCCATTGT	2-13-5 MOE	54	22
75965	75982	438369	TTATTCCATGGCCATTGT	5-8-5 MOE	33	40
75965	75984	438379	GeTdTunTdAdTeTeCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTdGeTd	Unidades desoxi MOE y	51	22
75965	75984	438441	GeTdTdTdAdTdTdCdCdAeTdGdGdCdCdAdTdTdGeTd	Unidades desoxi MOE y	40	22
75965	75984	438450	GeTeTeTdAdTeTeCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTdGeTd	Unidades desoxi MOE y	64	22
75965	75984	438459	GeTeTeTdAdTdTdCdCdAdTdGdGdCdCdAdTdTdGeTd	Unidades desoxi MOE y	68	22
75965	75984	438468	GTTTATTCCATGGCCATTGT	6-8-6 MOE	76	22

7596 6	759 85	4098 26	GGTTTATTCCATGGCCATTG	5-10-5 MOE	93	23
7596 6	759 85	4099 99	GGTTTATTCCATGGCCATTG	2-13-5 MOE	75	23
7596 6	759 83	4383 70	TTTATTCCATGGCCATTG	5-8-5 MOE	33	41
7596 6	759 85	4383 80	G _e G _e T _d T _d T _d A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _e	Unidades desoxi y MOE	63	23
7596 6	759 85	4384 42	G _e G _e T _d T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _d T _d G _e	Unidades desoxi y MOE	67	23
7596 6	759 85	4384 51	G _e G _e T _d T _d T _d A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _e T _e G _e	Unidades desoxi y MOE	83	23
7596 6	759 85	4384 60	G _e G _e T _d T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _d T _e T _e G _e	Unidades desoxi y MOE	82	23
7596 6	759 85	4384 69	GGTTTATTCCATGGCCATTG	6-8-6 MOE	71	23
7596 7	759 86	4041 72	TGGTTTATTCCATGGCCATT	5-10-5 MOE	76	24
7596 7	759 86	4100 00	TGGTTTATTCCATGGCCATT	2-13-5 MOE	83	24
7596 7	759 84	4383 71	GTTTATTCCATGGCCATT	5-8-5 MOE	54	42
7596 7	759 86	4383 81	TdGeGdTdTdTdAeTdTdCdCdAdTdGdGdCdCd ATeTd	Unidades desoxi y MOE	69	24
7596 7	759 86	4384 43	TdGeGdTdTdTdAdTdTdCdCdAdTdGdGdCdCd AdTeTe	Unidades desoxi y MOE	50	24
7596 7	759 86	4384 52	TdGeGeTdTdTdAeTdTdCdCdAdTdGdGdCdCd AeTeTe	Unidades desoxi y MOE	82	24
7596 7	759 86	4384 61	TdGeGeTdTdTdAdTeTeCdCdAdTdGdGdCdCd AeTeTe	Unidades desoxi y MOE	81	24
7596 7	759 86	4384 70	TGGTTTATTCCATGGCCATT	6-8-6 MOE	46	24
7596 8	759 87	4098 27	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	5-10-5 MOE	74	25
7596 8	759 87	4100 01	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	2-13-5 MOE	85	25
7596 8	759 85	4383 72	GGTTTATTCCATGGCCAT	5-8-5 MOE	52	43
7596 8	759 87	4383 82	AeTdGdGdTdTdTeTeAdTdTdCdCdAdTdGdGdCd CdAeTd	Unidades desoxi y MOE	65	25
7596 8	759 87	4384 44	AeTdGdGdTdTdTdAdTdTdCdCdAdTdGdGdCd CdAeTd	Unidades desoxi y MOE	72	25
7596 8	759 87	4384 53	AeTdGeGdTdTdTeTeAdTdTdCdCdAdTdGdGdCd CdAeTd	Unidades desoxi y MOE	72	25
7596 8	759 87	4384 62	AeTdGeGdTdTdTdAeTdTdCdCdAdTdGdGdCd CdAeTd	Unidades desoxi y MOE	70	25
7596 8	759 87	4384 71	ATGGTTTATTCCATGGCCAT	6-8-6 MOE	45	25
7596 9	759 88	4041 73	AATGGTTTATTCCATGGCCA	5-10-5 MOE	85	26

ES 2 634 450 T3

75969	75988	410002	AATGGTTTATTCCATGGCCA	2-13-5 MOE	85	26
75969	75986	438373	TGGTTTATTCCATGGCCA	5-8-5 MOE	70	44
75969	75988	438383	A _e A _e T _d G _d G _d T _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e	Unidades desoxi MOE	y54	26
75969	75988	438445	A _e A _e T _d G _d G _d T _d T _d T _d A _d T _e T _e C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e	Unidades desoxi MOE	y66	26
75969	75988	438454	A _e A _e T _d G _d G _d T _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e	Unidades desoxi MOE	y52	26
75969	75988	438463	A _e A _e T _d G _d G _d T _d T _d A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d A _e	Unidades desoxi MOE	y39	26
75969	75988	438472	AATGGTTTATTCCATGGCCA	6-8-6 MOE	73	26
75970	75989	142082	AAATGGTTTATTCCATGGCC	5-10-5 MOE	90	27
75970	75989	410003	AAATGGTTTATTCCATGGCC	2-13-5 MOE	86	27
75970	75987	438374	ATGGTTTATTCCATGGCC	5-8-5 MOE	79	45
75970	75989	438384	A _e A _e A _d T _d G _d G _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d	Unidades desoxi MOE	y53	27
75970	75989	438446	A _e A _e A _d T _d G _d G _d T _d T _d A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _d C _d C _d	Unidades desoxi MOE	y38	27
75970	75989	438455	A _e A _e A _e T _d G _d G _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _d C _d	Unidades desoxi MOE	y58	27
75970	75989	438464	A _e A _e A _e T _d G _d G _d T _d T _e T _e A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _d	Unidades desoxi MOE	y58	27
75970	75989	438473	AAATGGTTTATTCCATGGCC	6-8-6 MOE	57	27
75971	75990	409828	AAAATGGTTTATTCCATGGC	5-10-5 MOE	43	28
75971	75990	410004	AAAATGGTTTATTCCATGGC	2-13-5 MOE	58	28
75971	75988	438375	AATGGTTTATTCCATGGC	5-8-5 MOE	55	46
75971	75990	438385	A _e A _e A _d A _d T _d G _e G _e T _d T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _d	Unidades desoxi MOE	y36	28
75971	75990	438447	A _e A _e A _d A _d T _d G _d G _d T _d T _d A _e T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _d G _e C _d	Unidades desoxi MOE	y35	28
75971	75990	438456	A _e A _e A _e A _d T _d G _e G _e T _d T _d UN ₄ T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _e G _e C _d	Unidades desoxi MOE	y58	28
75971	75990	438465	A _e A _e A _e A _d T _d G _d GT _e T _e T _d A _d T _d T _d C _d C _d A _d T _d G _e G _e C _d	Unidades desoxi MOE	y51	28
75971	75990	438474	AAAATGGTTTATTCCATGGC	6-8-6 MOE	82	28
75972	75991	409829	AAAAATGGTTTATTCCATGG	5-10-5 MOE	42	29
75972	75989	438376	AAATGGTTTATTCCATGG	5-8-5 MOE	36	47

Ejemplo 6: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del ARNm de PTP1B humano en células HUVEC

Varios oligonucleótidos antisentido, que mostraron la inhibición antisentido significativa de PTP1B mRNA en el estudio descrito en el Ejemplo 5 se ensayaron adicionalmente en células HUVEC en diversas dosis. Las células se sembraron a una densidad de 2.000 células por pocillo y se transfectaron por electroporación con concentraciones de 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM y 4000 nM de cada oligonucleótido antisentido. Después de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto cebadores de sonda RTS3000. los niveles de PTP1B de mRNA se normalizaron al contenido de ARN total, medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en la Tabla 8 como porcentaje de inhibición de PTP1B mRNA, respecto a las células de control sin tratar.

Tabla 8

Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B humano en células HUVEC									
ISIS No	31,25 nM	62,5 nM	125,0 nM	250,0 nM	500,0 nM	1000,0 nM	2000,0 nM	4000,0 nM	Cl ₅₀ (mM)
142082	15	30	40	42	71	84	90	94	0,2
404173	15	19	33	54	69	81	86	93	0,2
404176	9	26	34	34	67	80	88	94	0,3
409826	17	16	28	44	60	73	85	95	0,3
410002	0	0	24	52	54	77	90	96	0,4
410003	9	7	19	46	60	80	91	95	0,4
438374	20	22	40	44	59	70	79	85	0,3
438460	14	21	23	42	62	78	85	95	0,3
438474	27	0	13	34	42	68	74	86	0,6

Ejemplo 7: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de humano ARNm de PTP1B en células HepG2

Los oligonucleótidos antisentido, ensayados en el estudio descrito en el Ejemplo 6, se ensayaron adicionalmente en células HepG2 a diversas dosis. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron por electroporación con concentraciones 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM, 2000 nM y 4000 nM de cada oligonucleótido antisentido, después de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de cebadores de sonda RTS3000, los niveles de PTP1B de mRNA se normalizaron al contenido de ARN total, medido por RIBOGREEN®, los resultados se presentan en la Tabla 9 como porcentaje de inhibición de PTP1B mRNA, respecto a las células de control sin tratar. Los niveles de mRNA también se analizaron usando el conjunto de cebadores de sonda mono rhesus RTS198, y los resultados se presentan en la Tabla 10. Los sitios de inicio y parada de cada oligonucleótido en SEQ ID NO: 3 de mono rhesus se presentan en la Tabla 11,

Tabla 9

Análisis de la inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B humano en células HepG2 utilizando RTS3000									
ISIS No	31,25 nM	62,5 nM	125,0 nM	250,0 nM	500,0 nM	1000,0 nM	2000,0 nM	4000,0 nM	Cl ₅₀ (μM)
142082	0	0	7	0	26	38	60	82	1,4
404173	2	0	1	19	0	29	47	80	1,9
404176	0	0	5	13	2	33	62	79	1,7
409826	0	0	0	2	15	29	46	76	1,9
410002	13	6	0	11	8	28	44	75	2,0
410003	0	0	9	11	22	33	30	83	1,9
438374	0	0	17	11	23	38	33	61	2,9
438460	4	0	10	11	9	26	52	79	1,8
438474	0	0	2	11	6	20	52	54	2,8

Tabla 10

Análisis de la inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B humano en células HepG2 utilizando RTS198									
ISIS No	31,25 nM	62,5 nM	125,0 nM	250,0 nM	500,0 nM	1000,0 nM	2000,0 nM	4000,0 nM	CI ₅₀ (MM)
142082	14	19	2	0	80	41	63	80	1,5
404173	0	0	2	0	16	26	60	83	1,6
404176	0	0	0	5	0	31	59	80	1,9
409826	0	0	0	16	23	10	49	72	2,3
410002	0	0	0	0	0	0	40	100	> 4,0
410003	0	1	12	0	10	41	51	82	1,6
438374	0	0	0	9	43	22	49	55	2,8
438460	0	0	0	9	30	42	47	81	1,4
438474	2	0	9	38	19	31	49	60	2,5

Tabla 11

Sitios diana de oligonucleótidos antisentido dirigidos a PTP1B en la secuencia del gen de mono rhesus (SEQ ID NO: 3)			
OligoID	Sitio de inicio	Sitio de parada	SEQ ID NO
142082	4495	4514	27
404173	4494	4513	26
404176	3571	3590	14
409826	4491	4510	23
410002	4494	4513	26
410003	4495	4514	27
438374	4495	4512	45
438460	4491	4510	23
438474	4496	4515	28

Ejemplo 8: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del ARNm de PTP1B humano en células HepG2

Oligonucleótidos antisentido cortos al lugar diana de ISIS 142082 fueron diseñados. Los sitios diana, motivos y detalles de secuencia de estos shortmers se presentan en la Tabla 12. Estos oligonucleótidos antisentido se ensayaron en células HepG2 a diversas dosis. Algunos de los oligonucleótidos antisentido desde el estudio descrito en el Ejemplo 7 se incluyeron en el ensayo para la comparación. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectaron por electroporación con concentraciones 78,125 nM, 156,25 nM, 312,5 nM, 625 nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM y 10.000 nM de cada oligonucleótido antisentido. Después de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de cebadores de sonda RTS3000. Los niveles de PTP1B de mRNA se normalizaron al contenido de ARN total, medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en la Tabla 13 como el porcentaje de inhibición de PTP1B mRNA, respecto a las células de control sin tratar.

Tabla 12

Sitios diana de oligonucleótidos antisentido dirigidos a la SEQ ID NO: 1					
ISIS No	Sitio de inicio	Sitio de parada	Secuencia	Motivo	SEQ ID NO
142082	3291	3310	AAATGGTTTATTCCATGGCC	5-10-5	27
446431	3292	3309	AATGGTTTATTCCATGGC	4-10-4	46
446432	3293	3308	ATGGTTTATTCCATGG	3-10-3	48

Tabla 13

Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B humano en células HepG2									
ISIS No	78,125 nM	156,25 nM	312,5 nM	625,0 nM	1250,0 nM	2500,0 nM	5000,0 nM	10000,0 nM	CI ₅₀ (μM)
113715	6	12	17	17	16	45	61	86	3,3
142082	14	34	23	47	60	81	86	90	0,8
404173	8	22	29	45	60	73	83	88	0,8
409826	19	18	41	56	75	84	89	91	0,5
410003	0	0	19	39	55	81	91	92	1,0
446431	10	24	26	38	57	74	85	92	1,0
446432	0	8	10	10	10	26	40	67	6,0

Ejemplo 9: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B mRNA en células LLC-MK2

Los oligonucleótidos antisentido del estudio descrito en el Ejemplo 8 también son de reacción cruzada con la secuencia del gen PTP1B mono rhesus (SEQ ID NO: 3) y se ensayaron adicionalmente en células LLC-MK2 de mono rhesus a diversas dosis. Las células se sembraron a una densidad de 25.000 células por pocillo y se transfectoron usando electroporación con concentraciones 78,125 nM, 156,25 nM, 312,5 nM, 625 nM, 1250 nM, 2500 nM, 5000 nM, y 10.000 nM de cada oligonucleótido antisentido. Después de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de cebadores de sonda RTS198. Los niveles de PTP1B de mRNA se normalizaron al contenido de ARN total, medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en la Tabla 14 como el porcentaje de inhibición de PTP1B mRNA, respecto a las células de control sin tratar. Los sitios de inicio y parada de cada oligonucleótido en la SEQ ID N°: 3 mono rhesus se presentan en la Tabla 15.

Tabla 14

Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B mRNA en células LLC-MK2									
ISIS No	78,125 nM	156,25 nM	312,5 nM	625,0 nM	1250,0 nM	2500,0 nM	5000,0 nM	10000,0 mM	CI ₅₀ (mM)
113715	0	0	4	13	27	53	57	70	3.3
142082	2	12	31	41	69	74	80	92	0.9
404173	2	0	22	29	36	61	78	84	1.6
409826	12	0	19	38	66	66	82	92	1.2
410003	0	0	0	26	32	65	81	91	1.8
446431	0	0	9	32	45	70	79	58	1.4
446432	0	0	7	16	10	20	26	43	37.0

Tabla 15

Sitios diana de oligonucleótidos antisentido dirigidos a la SEQ ID NO: 3				
ISIS No	Sitio de inicio	Sitio de parada	Secuencia	SEQ ID NO
113715	1035	1054	GCTCCTTCCACTGATCCTGC	10
142082	4495	4514	AAATGGTTTATTCCATGGCC	27
404173	4494	4513	AATGGTTTATTCCATGGCCA	26
409826	4491	4510	GGTTTATTCCATGGCCATTG	23
410003	4495	4514	AAATGGTTTATTCCATGGCC	27
446431	4496	4513	AATGGTTTATTCCATGGC	46
446432	4497	4512	ATGGTTTATTCCATGG	48

Ejemplo 10: Inhibición antisentido dependiente de la dosis del ARNm de PTP1B humano en células HUVEC

Los oligonucleótidos antisentido, ensayados en el estudio descrito en los Ejemplos 8 y 9, se ensayaron adicionalmente en células HUVEC en diversas dosis. Las células se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se transfectoron por electroporación con concentraciones 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM,

1000 nM, 2000 nM y 4000 nM de cada oligonucleótido antisentido. Después de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de cebadores de sonda RTS3000. Los niveles de PTP1B de mRNA se normalizaron al contenido de ARN total, medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en la Tabla 16 como el porcentaje de inhibición de PTP1B mRNA, respecto a las células de control sin tratar.

Tabla 16

Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B humano en células HUVEC									
ISIS No	31,25 nM	62,5 nM	125,0 nM	250,0 nM	500,0 nM	1000,0 nM	2000,0 nM	4000,0 nM	CI ₅₀ (MM)
113715	10	0	22	24	65	86	92	98	0,2
142082	52	78	89	93	95	96	98	98	<0,3
404173	35	66	80	89	95	98	97	97	0,05
409826	57	72	82	64	97	98	98	98	<0,3
410003	43	47	75	84	48	95	96	91	0,05
446431	33	63	75	87	96	97	98	98	0,05
446432	0	11	30	45	66	79	85	76	0,3

Ejemplo 11: Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B mRNA en hepatocitos primarios cynomolgus

Los oligonucleótidos antisentido del estudio descritos en los Ejemplos 8-10 se ensayaron adicionalmente en hepatocitos primarios cynomolgus a diversas dosis. Las células se sembraron a una densidad de 35.000 células por pocillo y se transfectaron usando electroporación con concentraciones 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1.000 nM, 2.000 nM, y 4.000 nM de cada oligonucleótido antisentido. Después de aproximadamente 16 horas, se aisló ARN de las células y los niveles de PTP1B de ARNm se midieron por PCR cuantitativa en tiempo real usando el conjunto de cebadores de sonda RTS198. Los niveles de PTP1B de mRNA se normalizaron al contenido de ARN total, medido por RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en la Tabla 17 como el porcentaje de inhibición de PTP1B mRNA, respecto a las células de control sin tratar.

Tabla 17

Inhibición antisentido dependiente de la dosis de PTP1B mRNA en hepatocitos primarios cynomolgus									
ISIS No	31,25 nM	62,5 nM	125,0 nM	250,0 nM	500,0 nM	1000,0 nM	2000,0 nM	4000,0 nM	CI ₅₀ (MM)
113715	4	26	25	43	46	73	82	95	0,4
142082	25	37	50	67	74	87	86	88	0,1
404173	18	20	43	54	67	82	85	89	0,2
409826	34	47	51	65	76	87	88	90	0,1
410003	8	20	44	53	68	79	80	83	0,2
446431	9	14	35	54	57	79	79	88	0,3
446432	4	0	1	3	0	11	6	37	> 4,0

Ejemplo 12: La tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos a PTP1B humano en un modelo de ratón

Oligonucleótidos ISIS que demostraron la inhibición dependiente de la dosis en los estudios descritos en los Ejemplos 8-11 fueron evaluados por tolerabilidad en un modelo de ratón monitorizando los cambios en los niveles de varios marcadores metabólicos en ratones CD1. Dos oligonucleótidos adicionales ISIS 446433 (4-10-4 MOE; 5'-GTTTATTCCATGGCCATT-3' (SEQ ID NO: 42); sitio de inicio diana en SEQ ID NO: 1 es de 3288) e ISIS 446434 (3-10-3; 5'-TTTATTCCATGGCCAT-3' (SEQ ID NO: 49); sitio de inicio diana en SEQ ID NO: 1 es 3289) fueron diseñados como shortmeros a ISIS 409826 (sitio de inicio diana en SEQ ID NO: 1 es 3287) y también se evaluaron en este estudio.

Tratamiento

Ratones CD1 (disponibles de Jackson Labs, Bar Harbor, ME) se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron con pienso normal de laboratorio *ad libitum* (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN). Los animales se aclimataron durante al menos 7 días en el centro de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido se prepararon en PBS y se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,2 micras. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Grupos de cinco ratones CD1 se inyectaron por vía subcutánea dos veces a la semana con 100 mg/kg de ISIS 142082, ISIS 373125, ISIS 404173, ISIS 409826, ISIS 410002, ISIS 410003, ISIS 438452, ISIS 438460, ISIS 446431, ISIS 446432, ISIS 446433, o ISIS 446434 durante 4 semanas. Un grupo de cinco ratones CD1 se inyectó por vía subcutánea dos veces a la semana con PBS durante 4 semanas. Este grupo PBS sirvió como el grupo control. Las muestras de sangre se recogieron a través de corte de cola. Dos días después de la última dosis, se tomaron los pesos corporales, los ratones fueron sacrificados y los órganos y plasma se recogieron para su posterior análisis.

Pesos corporales y de órganos

Los pesos corporales de los ratones se midieron semanalmente. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 18. Pesos del hígado, bazo y riñón se midieron al final del estudio, y se presentan en la Tabla 19. Los resultados demuestran que ninguno de los oligonucleótidos ISIS tenía ningún efecto adverso sobre la salud general de los ratones.

Tabla 18

Pesos semanales corporales de ratones CD1 durante el tratamiento de oligonucleótido antisentido (g)				
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
PBS	29	31	32	34
ISIS 142082	31	34	34	36
ISIS 373125	29	31	32	35
ISIS 404173	31	33	34	36
ISIS 409826	31	34	34	37
ISIS 410002	32	35	35	36
ISIS 410003	31	34	34	37
ISIS 438452	32	35	36	39
ISIS 438460	31	34	34	37
ISIS 446431	30	33	33	36
ISIS 446432	27	30	30	33
ISIS 446433	30	33	33	37
ISIS 446434	30	33	34	37

Tabla 19

Pesos de los órganos de ratones CD1 después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido (g)				
	Hígado	Grasa	Bazo	Riñón
PBS	1,7	0,45	0,11	0,53
ISIS 142082	2,3	0,33	0,18	0,52
ISIS 373125	1,9	0,38	0,16	0,53
ISIS 404173	2,3	0,41	0,23	0,59
ISIS 409826	2,2	0,37	0,17	0,54
ISIS 410002	1,9	0,22	0,30	0,76
ISIS 410003	2,1	0,44	0,22	0,60
ISIS 438452	2,2	0,42	0,18	0,55
ISIS 438460	2,2	0,34	0,17	0,52
ISIS 446431	2,1	0,34	0,19	0,53
ISIS 446432	1,7	0,31	0,13	0,46
ISIS 446433	2,2	0,35	0,17	0,53
ISIS 446434	2,2	0,36	0,18	0,56

Funcionamiento del hígado

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, los niveles plasmáticos de las transaminasas se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los niveles plasmáticos de ALT (transaminasa de alanina) y AST (transaminasa de aspartato) se

midieron dos veces por semana. Los resultados se presentan en las Tablas 20 y 21, e indican que la mayoría de los oligonucleótidos ISIS fueron considerados tolerables en los ratones, como se demuestra por su perfil de transaminasa hepática.

Tabla 20

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido en ALT (UI/L) de ratones CD1			
	Semana 0	Semana 2	Semana 4
PBS	27	26	20
ISIS 142082	38	35	105
ISIS 373125	30	27	51
ISIS 404173	30	31	124
ISIS 409826	26	34	236
ISIS 410002	27	203	219
ISIS 410003	31	29	99
ISIS 438452	32	40	217
ISIS 438460	30	40	216
ISIS 446431	29	38	114
ISIS 446432	26	27	35
ISIS 446433	25	76	115
ISIS 446434	23	44	146

Tabla 21

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de AST (UI/L) de ratones CD1			
	Semana 0	Semana 2	Semana 4
PBS	54	62	50
ISIS 142082	75	59	103
ISIS 373125	55	57	97
ISIS 404173	52	61	117
ISIS 409826	49	59	192
ISIS 410002	51	151	417
ISIS 410003	64	47	122
ISIS 438452	59	56	157
ISIS 438460	65	56	217
ISIS 446431	56	66	140
ISIS 446432	50	51	74
ISIS 446433	54	87	121
ISIS 446434	42	64	132

Niveles de glucosa en plasma

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre el metabolismo de la glucosa, los niveles plasmáticos de glucosa se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 22, expresados en mg/dL. Ninguno de los oligonucleótidos ISIS tenía ningún efecto adverso sobre el metabolismo de la glucosa de los ratones.

Tabla 22

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de glucosa en plasma en ratones CD1			
	Semana 0	Semana 2	Semana 4
PBS	175	188	182
ISIS 142082	195	178	161
ISIS 373125	187	201	177
ISIS 404173	185	213	168
ISIS 409826	183	187	187
ISIS 410002	183	164	137
ISIS 410003	198	218	168
ISIS 438452	168	197	175
ISIS 438460	212	203	169
ISIS 446431	192	188	148
ISIS 446432	194	193	175
ISIS 446433	216	198	151
ISIS 446434	199	189	159

Lípidos en plasma y niveles de triglicéridos

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre el colesterol y metabolismo de los triglicéridos, los niveles plasmáticos de cada se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en las Tablas 23 y 24, expresados en mg/dL. La mayoría de los oligonucleótidos ISIS no tienen ningún efecto adverso del metabolismo lipídico de los ratones.

Tabla 23

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de colesterol en plasma en ratones CD1			
	Semana 0	Semana 2	Semana 4
PBS	162	145	153
ISIS 142082	156	136	126
ISIS 373125	137	106	104
ISIS 404173	162	124	154
ISIS 409826	153	142	146
ISIS 410002	136	63	47
ISIS 410003	160	131	96
ISIS 438452	143	128	121
ISIS 438460	146	140	129
ISIS 446431	139	124	116
ISIS 446432	146	135	137
ISIS 446433	152	144	145
ISIS 446434	147	147	144

Tabla 24

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de triglicéridos en plasma en ratones CD1			
	Semana 0	Semana 2	Semana 4
PBS	153	153	162
ISIS 142082	170	153	114
ISIS 373125	142	116	112
ISIS 404173	195	140	107
ISIS 409826	182	120	80
ISIS 410002	137	99	51
ISIS 410003	152	138	102
ISIS 438452	123	134	93
ISIS 438460	165	146	85
ISIS 446431	131	160	123
ISIS 446432	168	194	136
ISIS 446433	186	117	133
ISIS 446434	145	101	84

Niveles de citoquinas

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS de factores implicados en la inflamación, se recogió sangre después del final del período de tratamiento para la medición de los niveles de citoquinas. Las muestras se enviaron a Aushon Biosystems (Woburn, MA) para el análisis. Los niveles de IL-6 murina, JE, MIP-1 α , y TNF- α se midieron usando los anticuerpos murinos. Los resultados se presentan en la Tabla 25. La mayor parte de los oligonucleótidos ISIS no tienen ningún efecto adverso sobre los niveles de citoquinas de los ratones.

Tabla 25

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de citoquinas en plasma en ratones CD1				
	mIL-6	MJE	mMIP-1 α	mTNF- α
PBS	250	20	1	4
ISIS 142082	225	145	4	23
ISIS 373125	77	91	3	17
ISIS 404173	88	155	1	24
ISIS 409826	33	112	3	15
ISIS 410002	113	225	28	84
ISIS 410003	111	138	4	24
ISIS 438452	62	148	1	15
ISIS 438460	64	184	2	9
ISIS 446431	52	170	1	15
ISIS 446432	57	75	1	3
ISIS 446433	64	138	3	61
ISIS 446434	59	127	0	21

Ejemplo 13: La tolerabilidad de oligonucleótidos antisentido dirigidos a PTP1B humano en un modelo de rata

Los oligonucleótidos ISIS del estudio descrito en el Ejemplo 12 se evaluaron adicionalmente para la tolerabilidad en un modelo de rata por seguimiento de los cambios en los niveles de varios marcadores metabólicos en ratas Sprague Dawley.

Tratamiento

Ratas Sprague Dawley se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron *ad libitum* de pienso normal de laboratorio (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN). Los animales se aclimataron durante al menos 7 días en el centro de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido se

prepararon en PBS y se esterilizan por filtración a través de un filtro de 0,2 micras. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Grupos de cuatro ratas cada uno se inyectaron por vía subcutánea dos veces a la semana con ISIS 142082, ISIS 373125, ISIS 404173, ISIS 409826, ISIS 410002, ISIS 410003, ISIS 438452, ISIS 438460, ISIS 446431, ISIS 446432, ISIS 446433 o ISIS 446434 a una dosis de 50 mg/kg dos veces a la semana durante 4 semanas, seguido de una dosis de 30 mg/kg dos veces a la semana durante 8 semanas. Un grupo de cuatro ratas se inyectó por vía subcutánea dos veces a la semana con PBS durante 12 semanas. Este grupo PBS sirvió como el grupo control. Las muestras de sangre se recogieron a través de corte de cola. Dos días después de la última dosis, se tomaron los pesos corporales, las ratas se sacrificaron y los órganos y el plasma se recogieron para su posterior análisis.

Pesos corporales y de órganos

Los pesos corporales de las ratas se midieron semanalmente. Los pesos corporales se presentan en la Tabla 26. Pesos de hígado, bazo y riñón se midieron al final del estudio, y se presentan en la Tabla 27. 'n/a' indica que no hay datos disponibles para ese grupo en particular en ese momento particular debido a que todas las ratas en el grupo se han sacrificado antes del momento.

Tabla 26

Pesos quincenales corporales de ratas Sprague Dawley durante el tratamiento de oligonucleótido antisentido (g)							
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
PBS	288	369	405	442	463	500	495
ISIS 142082	295	348	318	345	337	347	345
ISIS 373125	304	385	399	419	427	421	448
ISIS 404173	294	346	352	377	384	391	401
ISIS 409826	292	346	350	355	356	373	356
ISIS 410002	297	333	323	324	306	335	n/a
ISIS 410003	299	341	328	320	307	305	301
ISIS 438452	301	327	335	333	327	347	332
ISIS 438460	304	345	346	347	356	377	n/a
ISIS 446431	307	376	340	357	353	357	349
ISIS 446432	287	340	344	363	372	399	404
ISIS 446433	298	331	318	354	n/A	n/A	n/A
ISIS 446434	303	366	356	n/A	n/A	n/A	n/A

Tabla 27

Pesos de los órganos de ratas Sprague Dawley durante el tratamiento de oligonucleótido antisentido (g)				
	Hígado	Grasa	Bazo	Riñón
PBS	15,9	2,1	0,8	3,6
ISIS 142082	21,8	0,7	4,5	5,2
ISIS 373125	17,9	1,1	1,9	3,4
ISIS 404173	17,7	1,1	2,3	4,3
ISIS 409826	19,8	0,5	3,6	4,4
ISIS 410003	18,7	0,5	3,8	3,5
ISIS 438452	17,3	0,6	3,1	3,8
ISIS 446431	22,1	0,4	6,1	5,3
ISIS 446432	18,1	1,2	3,3	3,8

Función del hígado

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, los niveles plasmáticos de las transaminasas fueron medidos usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los niveles plasmáticos de ALT (transaminasa de alanina) y AST (transaminasa de aspartato) se

midieron dos veces por semana. Los niveles plasmáticos de bilirrubina (mg/dL) también se midieron usando el mismo analizador de química clínica. Los resultados se presentan en las Tablas 28, 29 y 30. 'n/a' indica que no hay datos disponibles para ese grupo en particular en ese punto de tiempo particular debido a que todas las ratas del grupo se han sacrificado antes del punto de tiempo.

Tabla 28

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido en ALT (UI/L) de ratas Sprague Dawley							
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
PBS	58	68	54	48	48	46	46
ISIS 142082	54	75	40	44	49	62	57
ISIS 373125	57	61	60	48	48	45	38
ISIS 404173	49	52	53	41	51	53	42
ISIS 409826	51	59	56	50	42	37	40
ISIS 410002	46	65	75	73	103	126	n/A
ISIS 410003	49	78	62	49	61	59	66
ISIS 438452	46	57	58	53	51	52	50
ISIS 438460	49	88	162	96	114	91	n/A
ISIS 446431	51	57	45	45	40	55	49
ISIS 446432	52	59	48	43	44	49	46
ISIS 446433	53	120	65	86	n/A	n/A	n/A
ISIS 446434	53	76	161	n/A	n/A	n/A	n/A

Tabla 29

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de AST (UI/L) de ratas Sprague Dawley							
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
PBS	84	92	86	79	91	74	81
ISIS 142082	87	89	86	126	136	154	149
ISIS 373125	79	72	93	124	111	95	81
ISIS 404173	75	69	88	75	89	96	83
ISIS 409826	75	74	96	112	108	90	106
ISIS 410002	67	87	155	173	229	245	n/A
ISIS 410003	71	95	106	136	161	160	186
ISIS 438452	70	84	104	157	164	174	167
ISIS 438460	79	122	214	287	216	172	n/A
ISIS 446431	73	79	93	137	129	158	153
ISIS 446432	80	76	86	99	96	105	102
ISIS 446433	77	151	128	234	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	81	137	359	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabla 30

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido sobre la bilirrubina (mg/dL) de ratas Sprague Dawley							
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
PBS	0,11	0,15	0,14	0,16	0,25	0,16	0,13
ISIS 142082	0,12	0,11	0,18	0,12	0,12	0,15	0,15
ISIS 373125	0,13	0,13	0,15	0,36	0,14	0,15	0,13
ISIS 404173	0,11	0,13	0,14	0,13	0,13	0,14	0,10
ISIS 409826	0,12	0,12	0,15	0,12	0,11	0,10	0,10
ISIS 410002	0,11	0,13	0,18	0,13	0,19	0,54	n/a
ISIS 410003	0,12	0,12	0,14	0,16	0,14	0,17	0,14
ISIS 438452	0,12	0,13	0,15	0,13	0,14	0,13	0,13
ISIS 438460	0,11	0,14	0,22	0,28	0,15	0,17	n/a
ISIS 446431	0,14	0,17	0,19	0,13	0,10	0,16	0,16
ISIS 446432	0,12	0,14	0,13	0,12	0,11	0,14	0,13
ISIS 446433	0,12	0,12	0,18	0,20	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	0,12	0,17	0,20	n/a	n/a	n/a	n/a

Funcionamiento del riñón

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, los niveles plasmáticos de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en las Tablas 31 y 32, expresados en mg/dL. La proteína total de orina a la proporción de creatinina también se calculó y los resultados se presentan en la Tabla 33.

Tabla 31

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de BUN (mg/dl) de ratas Sprague Dawley							
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
PBS	17	20	20	18	26	18	16
ISIS 142082	21	23	31	23	31	24	29
ISIS 373125	21	21	24	19	31	21	21
ISIS 404173	18	19	21	19	25	21	20
ISIS 409826	20	21	24	23	28	22	26
ISIS 410002	19	22	25	23	29	32	n/a
ISIS 410003	18	20	23	23	30	29	26
ISIS 438452	19	22	27	25	29	22	24
ISIS 438460	20	23	25	26	31	24	n/a
ISIS 446431	19	21	24	23	29	24	23
ISIS 446432	20	21	24	20	29	23	19
ISIS 446433	18	21	25	53	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	18	23	120	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabla 32

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido en la creatinina (mg/dL) de ratas Sprague Dawley							
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
PBS	0,2	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,3
ISIS 142082	0,3	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4
ISIS 373125	0,3	0,3	0,6	0,4	0,6	0,6	0,4
ISIS 404173	0,3	0,3	0,5	0,4	0,5	0,6	0,4
ISIS 409826	0,3	0,4	0,6	0,4	0,5	0,5	0,4
ISIS 410002	0,3	0,3	0,6	0,4	0,5	0,5	n/a
ISIS 410003	0,3	0,3	0,6	0,4	0,6	0,6	0,4
ISIS 438452	0,3	0,3	0,6	0,4	0,5	0,5	0,4
ISIS 438460	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,5	n/a
ISIS 446431	0,3	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,4
ISIS 446432	0,3	0,3	0,6	0,4	0,5	0,5	0,4
ISIS 446433	0,3	0,3	0,5	0,4	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	0,3	0,4	0,8	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabla 33

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de la proteína total de orina a la proporción de creatinina en orina de ratas Sprague Dawley							
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
PBS	1,5	1,4	1,2	1,6	1,3	1,2	1,2
ISIS 142082	1,2	4,3	4,0	7,7	6,6	7,5	7,4
ISIS 373125	1,3	3,9	3,8	6,7	6,2	8,8	9,7
ISIS 404173	1,1	4,8	5,5	6,4	7,4	10,2	11,9
ISIS 409826	1,2	3,7	3,8	5,9	9,8	28,8	37,6
ISIS 410002	1,2	3,9	4,1	6,0	9,7	26,3	n/a
ISIS 410003	1,3	4,5	5,3	5,9	7,6	10,8	18,0
ISIS 438452	1,4	3,3	3,1	5,1	8,0	9,2	10,5
ISIS 438460	1,3	4,0	4,5	7,3	16,0	53,9	n/a
ISIS 446431	1,2	4,5	5,0	5,3	7,2	8,0	8,8
ISIS 446432	1,3	4,2	4,4	6,2	9,1	7,6	9,2
ISIS 446433	1,1	3,4	5,7	81,5	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	1,1	3,7	25,8	n/a	n/a	n/a	n/a

Niveles de glucosa en plasma

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre el metabolismo de la glucosa, los niveles plasmáticos de glucosa se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 34, expresados en mg/dL.

Tabla 34

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de glucosa en plasma en ratas Sprague Dawley							
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
PBS	150	140	155	152	163	138	144
ISIS 142082	153	137	155	145	142	130	135
ISIS 373125	153	135	136	143	133	106	135
ISIS 404173	162	138	149	152	145	144	154
ISIS 409826	155	141	150	145	143	132	135
ISIS 410002	152	139	148	151	130	124	n/a
ISIS 410003	152	138	146	140	132	126	143
ISIS 438452	166	134	162	153	135	143	147
ISIS 438460	166	140	151	156	150	130	n/a
ISIS 446431	154	143	155	147	153	139	145
ISIS 446432	159	141	155	152	152	138	153
ISIS 446433	158	138	141	118	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	166	149	124	n/a	n/a	n/a	n/a

Lípidos en plasma y los niveles de triglicéridos

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre los niveles de colesterol total y de triglicéridos, los niveles plasmáticos de cada se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en las Tablas 35 y 36, expresados en mg/dL.

Tabla 35

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de colesterol en plasma (mg/dl) en ratas Sprague Dawley							
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10	Semana 12
PBS	55	57	64	51	73	64	53
ISIS 142082	62	41	54	62	70	64	62
ISIS 373125	73	59	66	51	66	61	39
ISIS 404173	57	41	68	62	87	85	75
ISIS 409826	57	42	79	65	86	122	110
ISIS 410002	69	57	75	65	73	96	n/a
ISIS 410003	72	44	70	67	89	76	73
ISIS 438452	63	33	53	51	71	70	61
ISIS 438460	64	40	98	81	94	146	n/a
ISIS 446431	64	41	56	54	63	68	59
ISIS 446432	62	44	70	50	80	80	65
ISIS 446433	59	63	95	139	n/a	n/a	n/a
ISIS 446434	63	48	91	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabla 36

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de triglicéridos en plasma (mg/dl) en ratas Sprague Dawley						
	Semana 0	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 10
PBS	66	73	82	80	98	106
ISIS 142082	92	30	71	44	25	28
ISIS 373125	66	28	20	24	24	28
ISIS 404173	48	28	28	35	31	49
ISIS 409826	68	29	28	25	31	68
ISIS 410002	71	23	23	27	71	n/a
ISIS 410003	78	22	22	37	30	64
ISIS 438452	89	33	39	34	50	35
ISIS 438460	98	20	34	35	33	n/a
ISIS 446431	72	29	38	36	35	48
ISIS 446432	n/a	41	37	31	37	53
ISIS 446433	68	21	29	129	n/a	n/a
ISIS 446434	60	27	103	n/a	n/a	n/a

Niveles de citoquinas

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS de factores implicados en la inflamación, se recogió sangre después del final del período de tratamiento para la medición de los niveles de citoquinas. Las muestras se enviaron a Aushon Biosystems (Woburn, MA) para el análisis. Los niveles de rata IL-6, MCP-1, MIP-1 α , y TNF- α se midieron con sus respectivos anticuerpos. Los resultados se presentan en la Tabla 37.

Tabla 37

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de citoquinas en plasma en ratas Sprague Dawley				
	rIL-6	rMCP-1	rMIP-1 α	rTNF- α
PBS	315	403	6	77
ISIS 142082	74	3082	38	697
ISIS 373125	<25	2215	7	15
ISIS 404173	125	2244	60	499
ISIS 409826	<25	6041	52	100
ISIS 410003	245	3315	40	444
ISIS 438452	105	4513	26	519
ISIS 446431	924	3104	54	402
ISIS 446432	29	2007	46	610

Ejemplo 14: Medición de la viscosidad de oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos a PTP1B humana

La viscosidad de los oligonucleótidos antisentido seleccionados de estudios descritos en los Ejemplos 12 y 13 se midió con el objetivo de filtrar los oligonucleótidos antisentido que tienen una viscosidad de más de 40 cP a una concentración de 165-185 mg/mL. Los oligonucleótidos que tienen una viscosidad mayor que 40 cP serían demasiado viscosos para ser administrados a cualquier sujeto.

Oligonucleótidos ISIS (32-35 mg) se pesaron en un vial de vidrio, se añadieron 120 ml de agua y el oligonucleótido antisentido se disolvió en solución calentando el vial a 50°C. Parte de (75 ml) la muestra precalentada se pipeteó a un micro-viscosímetro (Cambridge). La temperatura de micro-viscosímetro se fijó a 25°C y se midió la viscosidad de la muestra. Otra parte (20 ml) de la muestra precalentada se pipeteó en 10 ml de agua para lectura UV a 260 nm a 85°(instrumento Cary UV) C. Los resultados se presentan en la Tabla 38 e indican que todas las soluciones de oligonucleótidos antisentido son óptimos en su viscosidad bajo el criterio indicado anteriormente.

Tabla 38

La viscosidad y la concentración de oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos a PTP1B humana		
ISIS N°	Viscosidad (cP)	Concentración (mg/ml)
142082	3,8	188
404173	3,8	163
410003	4,5	176
446431	3,2	180
446432	2,4	175

Ejemplo 15: Estudio de tolerabilidad de seis meses de los oligonucleótidos antisentido dirigidos a PTP1B humano en un modelo de ratón

Oligonucleótidos de ISIS seleccionados de los estudios descritos en los Ejemplos 12-14 se evaluaron para determinar tolerabilidad a largo plazo en un modelo de ratón monitorizando los cambios en los niveles de varios marcadores metabólicos en ratones CD1.

Tratamiento

Ratones CD1 machos se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y alimentados ad libitum de pienso normal de laboratorio (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN). Los animales se aclimataron durante al menos 7 días en el centro de investigación antes del inicio del experimento. Los oligonucleótidos antisentido se prepararon en PBS y se esterilizaron por filtración a través de un filtro de 0,2 micras. Los oligonucleótidos se disolvieron en 0,9% de PBS para inyección.

Grupos de diez ratones cada uno CD1 se inyectaron por vía subcutánea dos veces a la semana con 25 mg/kg de ISIS 142082, ISIS 404173, ISIS 446431 o durante 24 semanas. Un grupo de diez ratones CD1 se inyectó por vía subcutánea dos veces a la semana con PBS durante 24 semanas. Este grupo PBS sirvió como el grupo de control. Las muestras de sangre se recogieron en los días 140 a través de las hemorragias mandibulares. En el día 168, se recogió sangre mediante punción cardiaca terminal bajo anestesia de CO₂, los ratones fueron sacrificados y los órganos se recogieron para su posterior análisis.

Niveles de glucosa en plasma

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre el metabolismo de la glucosa, los niveles plasmáticos de glucosa se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 39, expresados en mg/dL.

Tabla 39

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de glucosa en plasma en el día 168	
	Glucosa
PBS	214
ISIS 142082	177
ISIS 404173	204
ISIS 446431	191

Funcionamiento del hígado

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, los niveles plasmáticos de las transaminasas fueron medidos usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Se midieron los niveles plasmáticos de ALT (transaminasa de alanina) y AST (transaminasa de aspartato) en el día 168. Los niveles plasmáticos de bilirrubina (mg/dL) también se midieron usando el mismo analizador de química clínica. La fosfatasa alcalina, que se sintetiza en cantidades incrementadas por las células hepáticas dañadas, también es un marcador de la enfermedad del hígado (Narayanan, S. Ann Clin Lab Sci 21: 12-8, 1991) y se midió de manera similar. La albúmina, que normalmente se disminuyó en la enfermedad hepática (Oettl, K. et al, Biochim Biophys Acta 1782: 469-73, 2008), también se midió de manera similar. Los resultados se presentan en la Tabla 40.

Tabla 40

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de marcadores metabólicos de hígado en el día 168					
	ALT (UI/L)	AST (UI/L)	Bilirrubina (mg/dL)	Fosfatasa alcalina (IU/L)	Albúmina (g/dL)
PBS	50	82	0.2	44	2,5
ISIS 142082	148	197	0.1	56	2,3
ISIS 404173	68	137	0.1	57	2,5
ISIS 446431	115	173	0.1	42	2,4

Función cardíaca

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función cardíaca, los niveles plasmáticos de creatina fosfoquinasa (CPK) se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) en el día 168. Un aumento en el nivel de este marcador indica lesión del músculo cardíaco (Barohn, RJ En: Goldman L, Ausiello D, eds Cecil Medicine 23a ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2007: capítulo 447). Los resultados se presentan en la Tabla 41.

Tabla 41

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido en CPK marcador cardíaco en día 168	
	CPK (IU/L)
PBS	98
ISIS 142082	120
ISIS 404173	107
ISIS 446431	159

Función pancreática

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función pancreática, los niveles plasmáticos de amilasa se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY) en el día 168. Un aumento en el nivel de este marcador indica la pancreatitis aguda (Sternby, B. et al., Mayo Clin Proc 71: 1138-1144, 1996). Los resultados se presentan en la Tabla 42.

Tabla 42

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de amilasa pancreática marcador en día 168	
	Amilasa (IU/L)
PBS	1101
ISIS 142082	1374
ISIS 404173	1280
ISIS 446431	1232

Función del riñón

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, los niveles plasmáticos de nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina se midieron usando un analizador de química clínica automatizada (Hitachi Olympus AU400e, Melville, NY). Los resultados se presentan en la Tabla 43, expresados en mg/dL.

Tabla 43

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de marcadores metabólicos de riñón en el día 168		
	BOLLO	creatinina
PBS	20	0,3
ISIS 142082	24	0,2
ISIS 404173	21	0,2
ISIS 446431	19	0,3

Ejemplo 16: Medición de la vida media de oligonucleótido antisentido en hígado de ratón CD1

Ratones CD1 se trataron con los oligonucleótidos antisentido ISIS seleccionados de estudios descritos en el Ejemplo 14, y la vida media de oligonucleótidos, así como el tiempo transcurrido para la degradación de oligonucleótidos y la eliminación desde el hígado se evaluó.

Tratamiento

Grupos de diez ratones cada uno CD1 se inyectaron por vía subcutánea dos veces por semana durante 2 semanas con 50 mg/kg de ISIS 142082, ISIS 446431, ISIS 404173 o ISIS 409826. Cinco ratones de cada grupo fueron sacrificados 3 días y 56 días después de la dosis final. Los hígados se recogieron para su análisis.

Medición de la concentración de oligonucleótido

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa. El método utilizado es una modificación de métodos publicados previamente (Leeds et al, 1996; Geary et al, 1999) que constan de una extracción de fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida de una extracción en fase sólida. Un estándar interno (ISIS 355868, un oligonucleótido de fosforotioato modificado de 27-mer 2'-O-metoxietilo, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, designado aquí como SEQ ID NO: 50) se añadió antes de la extracción. Concentraciones de la muestra de tejido se calcularon utilizando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 mg/g. Vidas medias se calcularon entonces utilizando el software WinNonlin (Pharsight).

Los resultados se presentan en la Tabla 44. Los oligonucleótidos antisentido con vidas medias dentro de 11-34 días fueron elegidos para estudios posteriores.

Tabla 44

Concentración de longitud completa de oligonucleótido (mg/g) y vida media (días) de oligonucleótido en hígado de ratón CD1			
	Días	Conc. de cuerpo entero. (Mg/g)	Vida media (días)
142082	3	265	19,8
	56	42	
446431	3	293	19,6
	56	45	
404173	3	281	14,8
	56	24	
409826	3	304	18,4
	56	41	

Ejemplo 17: Efecto de los oligonucleótidos antisentido ISIS dirigidos a PTP1B humana en monos cynomolgus

Monos cynomolgus se trataron con oligonucleótidos antisentido ISIS de los estudios descritos en los Ejemplos 15 y 16. Eficacia y tolerabilidad de oligonucleótido antisentido, así como su perfil farmacocinético en el hígado y el riñón, se evaluaron.

Tratamiento

Antes del estudio, los monos se mantuvieron en cuarentena durante un período de tiempo de 30 días, durante el cual los paneles estándar de la química del suero y la hematología, el examen de muestras de heces para huevos y parásitos, y una prueba de la tuberculosis, se llevaron a cabo para excluir monos anormales o enfermos.

Seis grupos asignados aleatoriamente de tres monos cynomolgus machos y dos hembras se inyectaron por vía subcutánea tres veces por semana durante la primera semana, y posteriormente, una vez a la semana durante las próximas 12 semanas, ya sea con 8 mg/kg o 40 mg/kg de ISIS 142082, ISIS 446431 o ISIS 404173. Un grupo de monos cynomolgus con tres machos y dos hembras se inyectaron por vía subcutánea tres veces por semana durante la primera semana, y posteriormente, una vez a la semana para las próximas 12 semanas con 40 mg/kg de ISIS 409826. Un grupo de control de monos cynomolgus con tres machos y dos hembras se inyectó por vía subcutánea tres veces por semana durante la primera semana, y posteriormente, una vez a la semana durante las próximas 12 semanas con PBS. Sacrificios terminales de todos los grupos se llevaron a cabo 48 horas después de la última dosis, en el día 93.

Durante el período de estudio, se observaron los monos diariamente para detectar signos de enfermedad o angustia. Cualquier animal que muestra los efectos adversos para el tratamiento se retiró y se refirió al veterinario y Director del Estudio.

Estudios de inhibición

Análisis de ARN

Se extrajo ARN de hígado y los tejidos adiposos abdominales para análisis en tiempo real PCR de PTP1B utilizando el conjunto de cebadores de sonda 1 (secuencia delantera GACCAGCTGCGCTTCTCCTA, designada aquí como SEQ ID NO: 51; secuencia inversa CAGAGGAGTCCCCCATGATG, designada aquí como SEQ ID NO: 52; secuencia de la sonda TTGGCTGTGATCGAAGGTGCCAAA, designada aquí como SEQ ID NO: 53) o el conjunto de cebadores de sonda 2 (secuencia delantera GGGCCCTTTGCCTAACACA, designada aquí como SEQ ID NO: 54; secuencia inversa CGACACCCCTGCTTTTCTG, designada aquí como SEQ ID NO: 55; secuencia de sonda CGGTCACCTTTGGGAGATGGTGTGG, designada aquí como SEQ ID NO: 56), cada una dirigida a diferentes regiones del ARNm de PTP1B. Los resultados se presentan como porcentaje de reducción de PTP1B mRNA, con respecto al control de PBS, normalizada con RIBOGREEN®. Como se muestra en la Tabla 45, el tratamiento con oligonucleótidos antisentido ISIS resultó en una reducción significativa de PTP1B mRNA en comparación con el control de PBS. El tratamiento con ISIS 404173 causó la reducción de los niveles de PTP1B de mRNA similar a la del tratamiento con ISIS 142082.

Tabla 45

La inhibición de PTP1B mRNA en el hígado de mono cynomolgus y tejido graso relativo al control PBS					
ISIS Nº	Dosis (mg/kg)	% de inhibición en el hígado (conjunto de sonda 1)	% de inhibición en el hígado (conjunto de sonda 2)	% de inhibición en el tejido graso (conjunto de sonda 1)	% de inhibición en el tejido graso (conjunto de sonda 2)
409826	40	38	45	17	21
142082	8	12	14	13	16
	40	46	48	34	28
446831	8	0	8	6	1
	40	8	18	14	12
404173	8	4	13	8	4
	40	26	22	38	31

Análisis de proteínas

El tejido se extrae de hígado para la medición de los niveles de proteína PTP1B mediante análisis de transferencia western. Específicamente, las muestras de proteína PTP1B de monos tratados con ISIS 404173 se compararon con los tratados con ISIS 142082. Los resultados se presentan en las Tablas 46, 47 y 48 expresados como porcentaje de reducción en comparación con los niveles de control. Los niveles de PTP1B se normalizaron contra los niveles de proteína total, así como contra una proteína expresada constitutivamente, IR-β. El tratamiento con ISIS 404173 causó una mayor reducción de la proteína en el hígado PTP1B a la del tratamiento con ISIS 142082 en la dosis más baja de 8 mg/kg (Tabla 47).

Tabla 46

Reducción del nivel de proteína PTP1B después del tratamiento con ISIS 404173 en el hígado de mono cynomolgus		
Dosis (mg/kg)	% de inhibición (normalizado a la proteína total)	% de inhibición (normalizado a IR-P)
8	49	42
40	67	66

Tabla 47

Reducción del nivel de proteína PTP1B después del tratamiento con ISIS 404173 o ISIS 142082 a 8 mg/kg en el hígado de mono cynomolgus		
ISIS No	% de inhibición (normalizado a la proteína total)	% de inhibición (normalizado a IR-β)
142082	20	4
404173	33	27

Tabla 48

Reducción del nivel de proteína PTP1B después del tratamiento con ISIS 404173 o ISIS 142082 a 40 mg/kg en el hígado de mono cynomolgus		
ISIS No	% de inhibición (normalizado a la proteína total)	% de inhibición (normalizado a IR-β)
142082	65	63
404173	60	56

Estudios de tolerancia

Mediciones de peso corporal y de órganos

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS en la salud general de los animales, los pesos corporales y de órganos se midieron después del sacrificio terminal. Los pesos corporales se midieron y se compararon con los de los animales de control de PBS. Los pesos de los órganos se midieron y los pesos de los grupos de tratamiento se compararon con los correspondientes pesos de control de PBS. Los datos se presentan en la Tabla 49. El tratamiento con ISIS 142082 causó aumentos en el peso del hígado y del riñón en la dosis más alta.

Tabla 49

Pesos corporales y peso de los órganos finales en el mono cynomolgus relativos al control						
	Dosis (mg/kg)	Peso corporal (kg)	Riñón (g)	Hígado (g)	Bazo (g)	Músculo gastrocnemio (g)
PBS	-	2,2	9,6	10,5	2,3	10,6
409826	40	2,3	14,0	18,5	6,0	8,8
142082	8	2,3	10,6	13,0	3,7	9,5
	40	2,2	20,9	17,7	7,0	9,0
446431	8	2,3	11,6	12,7	4,8	10,2
	40	2,3	15,9	16,1	9,6	7,7
404173	8	2,3	11,6	12,8	4,8	11,1
	40	2,2	14,8	15,5	3,7	8,7

Función del hígado

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función hepática, las muestras de sangre se recogieron de todos los grupos de estudio 7 días antes del inicio del tratamiento, así como en los días 30, 58, y 93 del período de tratamiento. Las muestras de sangre se recogieron en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 90 min y después se centrifugaron (3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente) para obtener el suero.

Los niveles de transaminasas se midieron usando un analizador de química NEO Toshiba 200FR (Toshiba Co., Japón). Los niveles plasmáticos de ALT (transaminasa de alanina) y AST (transaminasa de aspartato) se midieron y los resultados se presentan en las Tablas 50 y 51, expresados en IU/L. La fosfatasa alcalina, que se sintetiza en cantidades incrementadas por las células hepáticas dañadas y también es un marcador de la enfermedad del hígado y se midió de manera similar, y los datos se presentan en la Tabla 52. Los niveles de AST, ALT y fosfatasa alcalina en todos los grupos de tratamiento eran similares a los del grupo de control PBS.

Proteína C-reactiva (PCR), que se sintetiza en el hígado y que sirve como un marcador de la inflamación, también se midió de manera similar, y los datos se presentan en la Tabla 53. El tratamiento con ISIS 142082 e ISIS 409826 en la dosis más alta dio lugar a altos niveles de PCR, lo que sugiere la inflamación del hígado.

La bilirrubina es también un marcador metabólico del hígado y se midió de manera similar y se presenta en la Tabla 54, expresada en mg/dL. Se encontró que los niveles de bilirrubina de todos los grupos de tratamiento eran similares a los del grupo de control PBS. Gammaglutamiltransferasa (GGT) es una enzima producida en el hígado y es un marcador de laboratorio útil de daño hepático temprano o enfermedad colestática (Betro, MG et al, Am J. Clin Pathol 60: 672-8,1973). Los niveles de GGT se midieron y los resultados se presentan en la Tabla 55, y no demuestran ninguna diferencia en el control de PBS y los grupos de tratamiento.

Tabla 50

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido en ALT (UI/L) en el suero de mono cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	37	44	42	35
409826	40	39	51	86	74
142082	8	37	39	45	36
	40	49	62	59	69
446431	8	52	54	67	86
	40	38	58	87	99
404173	8	34	50	41	45
	40	44	50	63	73

Tabla 51

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de AST (UI/L) en el suero de mono cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	40	49	55	44
409826	40	48	53	73	59
142082	8	44	45	49	42
	40	54	70	72	69
446431	8	57	43	48	50
	40	41	60	63	81
404173	8	44	53	57	59
	40	46	65	71	74

Tabla 52

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de la fosfatasa alcalina (IU/L) en el suero de mono cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	784	834	1021	838
409826	40	728	883	1178	981
142082	8	718	739	788	688
	40	666	656	711	774
446431	8	742	745	885	908
	40	778	759	768	735
404173	8	888	957	1135	1155
	40	931	958	1135	1263

Tabla 53

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de PCR (mg/l) en plasma de mono cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	1,0	1,8	1,4	1,2
409826	40	1,0	4,3	4,8	4,8
142082	8	0,8	1,2	0,9	1,0
	40	0,8	2,6	3,4	12,1
446431	8	1,4	1,4	0,9	1,1
	40	0,8	2,4	2,2	6,7
404173	8	1,4	1,9	1,5	1,8
	40	3,1	1,6	1,2	1,6

Tabla 54

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido sobre la bilirrubina (mg/dL) en plasma de mono cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	0,19	0,20	0,20	0,17
409826	40	0,17	0,13	0,13	0,10
142082	8	0,17	0,18	0,16	0,14
	40	0,16	0,13	0,13	0,08
446431	8	0,21	0,17	0,18	0,15
	40	0,19	0,18	0,15	0,12
404173	8	0,23	0,19	0,20	0,16
	40	0,22	0,15	0,14	0,13

Tabla 55

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido en GGT (UI/l) en plasma de mono cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	65	74	79	71
409826	40	84	86	94	87
142082	8	63	67	68	62
	40	67	72	71	61
446431	8	60	62	62	63
	40	61	58	62	60
404173	8	57	66	66	68
	40	56	63	69	79

Función del riñón

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre la función renal, las muestras de sangre se recogieron de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recogieron en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 90 min y después se centrifugaron (3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente) para obtener el suero. Los niveles de BUN y creatinina se midieron 7 días antes del inicio del tratamiento, así como en los días 30, 58 y 93 del periodo de tratamiento usando un analizador de química NEO Toshiba 200FR (Toshiba Co., Japón). Los resultados se presentan en las Tablas 56 y 57, expresados en mg/dL. El tratamiento con oligonucleótidos ISIS no tuvo efectos adversos en cualquiera de BUN o los niveles de creatinina.

Tabla 56

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de BUN en suero (mg/dL) en monos cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	28	28	25	28
409826	40	32	30	28	32
142082	8	26	25	24	26
	40	28	28	25	25
446431	8	28	27	25	26
	40	28	27	25	28
404173	8	28	30	24	27
	40	28	24	25	23

Tabla 57

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de creatinina sérica (mg/dL) en monos cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	0,83	0,88	0,94	0,78
409826	40	0,77	0,84	0,92	0,82
142082	8	0,74	0,78	0,79	0,71
	40	0,72	0,80	0,86	0,73
446431	8	0,79	0,75	0,83	0,71
	40	0,76	0,83	0,88	0,77
404173	8	0,81	0,91	0,87	0,82
	40	0,76	0,84	0,92	0,76

Niveles de colesterol y triglicéridos

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS sobre el metabolismo lipídico, las muestras de sangre se recogieron de todos los grupos de estudio. Las muestras de sangre se recogieron en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 90 min y después se centrifugaron (3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente) para obtener el suero. Las concentraciones de colesterol y triglicéridos se midieron 7 días antes del inicio del tratamiento, así como en los días 30, 58 y 93 del periodo de tratamiento usando un analizador de química NEO Toshiba 200FR (Toshiba Co., Japón). Los resultados se presentan en las Tablas 58 y 59, expresados en mg/dL. El tratamiento con oligonucleótidos ISIS no tuvo efectos adversos en cualquiera de los niveles de colesterol o de triglicéridos.

Tabla 58

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de colesterol en suero (mg/dL) en monos cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	135	163	162	143
409826	40	153	150	140	116
142082	8	116	151	159	141
	40	110	140	138	128
446431	8	125	144	141	133
	40	93	99	95	81
404173	8	123	147	149	136
	40	135	135	125	124

Tabla 59

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de triglicéridos en suero (mg/dL) en monos cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	47	55	45	54
409826	40	30	29	33	42
142082	8	23	31	37	32
	40	28	28	35	42
446431	8	24	46	34	33
	40	31	44	47	56
404173	8	28	38	25	28
	40	30	38	45	34

Hematología

Para evaluar cualquier efecto inflamatorio de oligonucleótidos ISIS en monos cynomolgus, muestras de sangre fueron de aproximadamente 0,5 ml de sangre se recogió de cada uno de los animales de estudio disponibles en tubos que contienen la sal de potasio de EDTA. Se analizaron las muestras para recuento de glóbulos rojos (RBC), glóbulos blancos (WBC), el recuento de plaquetas y el contenido de hemoglobina, utilizando un analizador de hematología ADVIA120 (Bayer, EE.UU.). Los datos se presentan en las Tablas 60-63. El tratamiento con oligonucleótidos ISIS no alteró significativamente el recuento de células de sangre o los niveles de hemoglobina, en comparación con el control.

Tabla 60

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$) en monos cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	11,6	12,6	11,1	8,9
409826	40	12,4	12,7	15,3	10,8
142082	8	11,3	15,2	12,8	9,7
	40	11,9	13,2	12,5	8,5
446431	8	9,7	13,4	12,7	9,3
	40	10,7	11,5	11,9	10,2
404173	8	14,9	18,9	14,9	11,8
	40	11,1	14,2	12,9	10,8

Tabla 61

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido de RBC ($\times 10^6/\text{MI}$) en monos cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	5,5	5,6	5,8	5,1
409826	40	5,6	5,8	6,1	5,6
142082	8	5,4	5,4	5,6	5,2
	40	5,7	5,6	5,8	5,5
446431	8	5,5	5,3	5,5	5,4
	40	5,5	5,4	5,8	5,3
404173	8	5,9	5,9	6,1	5,7
	40	5,1	5,4	5,5	5,5

Tabla 62

Efecto del tratamiento con oligonucleótido antisentido en las plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{l}$) en monos cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	592	555	571	516
409826	40	536	493	400	338
142082	8	439	477	349	284
	40	461	454	401	263
446431	8	438	397	359	282
	40	516	337	369	323
404173	8	489	491	420	355
	40	520	470	389	316

Tabla 63

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de hemoglobina (g/dL) en monos cynomolgus					
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	12,5	12,8	13,1	11,9
409826	40	12,6	12,8	13,3	12,5
142082	8	12,3	12,5	13,0	12,2
	40	12,1	12,0	12,1	11,5
446431	8	12,3	12,1	12,4	12,6
	40	12,7	12,6	13,3	12,4
404173	8	12,7	13,0	13,3	12,7
	40	11,6	12,3	12,4	12,6

Análisis de los factores de inflamación

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS para el análisis de complemento C3 como un factor de la inflamación, se recogió sangre de todos los animales disponibles en tubos sin anticoagulante para la separación de suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 90 min y después se centrifugaron (3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente) para obtener el suero. El complemento C3 se midió usando un analizador automático (Toshiba 200 analizador de química FR NEO, Toshiba co., Japón). Los datos se presentan en la Tabla 64, expresada en mg/dL. El tratamiento con ISIS 409826 resultó en niveles bajos de complemento C3, lo que indica un estado de enfermedad.

Tabla 64

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de C3 en suero (mg/dL) en monos cynomolgus						
	Dosis (mg/kg)	Día -7	Día 1	Día 30	Día 58	Día 93
PBS	-	136	138	148	149	129
409826	40	129	131	101	101	90
142082	8	126	135	126	127	111
	40	133	134	106	121	111
446431	8	130	144	128	132	125
	40	129	130	111	117	114
404173	8	127	136	137	136	127
	40	125	134	101	103	102

Análisis de los niveles de insulina

Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos ISIS en la glándula tiroides, se recogió sangre en los días 42, 84 y 91 a partir de animales en ayunas durante la noche en tubos tratados con EDTA. Los tubos se mantuvieron en

hielo y se obtuvo plasma tras la centrifugación (3000 rpm durante 10 min a 4°C) dentro de 30 min de recogida de sangre. Los niveles de insulina se midieron usando un analizador automático (Toshiba 200 analizador de química FR NEO, Toshiba co., Japón). Los datos se presentan en la Tabla 65, expresada en ng/mL.

Tabla 65

Efecto del tratamiento con oligonucleótidos antisentido en los niveles de insulina en plasma (ng/ml) en monos cynomolgus				
	Dosis (mg/kg)	Día 42	Día 84	Día 91
PBS	-	29	26	26
409826	40	14	22	15
142082	8	8	4	8
	40	8	10	10
404173	8	9	10	7
	40	6	3	2

Estudios farmacocinéticos

Medición de la concentración de oligonucleótido

Se midió la concentración del oligonucleótido de longitud completa, así como la concentración de oligonucleótido total (incluyendo la forma degradada). El método utilizado es una modificación de los métodos publicados anteriormente; que consisten de una extracción de fenol-cloroformo (líquido-líquido) seguida de una extracción en fase sólida (Leeds et al., 1996 Geary et al., 1999). Un estándar interno (ISIS 355868, un oligonucleótido de fosforotioato modificado de 27-mer 2'-O-metoxietilo, GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT, designado aquí como SEQ ID NO: 50) se añadió antes de la extracción. Concentraciones de la muestra de tejido se calculan utilizando curvas de calibración, con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de aproximadamente 1,14 mg/g. Los resultados se presentan en las Tablas 66 y 67, expresados como mg/g de tejido. Se calculó la relación de las concentraciones en el riñón en comparación con el hígado. El tratamiento con oligonucleótidos ISIS no dio como resultado ninguna anomalía en la relación. Los resultados indican que ISIS 404173 es un acumulador renal mejor que ISIS 142082 en la dosis más alta.

Tabla 66

Concentración de oligonucleótido total (mg/g) en el hígado de mono cynomolgus				
ISIS N°	Dosis (mg/kg)	Riñón	Hígado	Relación riñón/hígado
409826	40	4424	954	4,64
142082	8	1688	1044	1,62
	40	6385	1774	3,60
446431	8	1323	641	2,06
	40	6662	1159	5,75
404173	8	971	712	1,36
	40	7180	1464	4,90

Tabla 67

Concentración de oligonucleótido de longitud completa (mg/g) en el hígado de mono cynomolgus				
ISIS N°	Dosis (mg/kg)	Riñón	Hígado	Kidney relación/hígado
409826	40	3472	728	4,77
142082	8	1232	653	1,89
	40	4103	1244	3,30
446431	8	1204	416	2,89
	40	5645	846	6,67
404173	8	650	424	1,53
	40	5039	1094	4,61

LISTADO DE SECUENCIAS

[0503]

5 <110> Isis Pharmaceuticals, Inc.
Sanjay Bhanot
Susan M. Freier

<120> MODULACIÓN ANTISENTIDO DE LA EXPRESIÓN DE **PTP1B**

10 <130> BIOL0149WO

<150> 61/474.981

<151> 2011-04-13

15 <160> 56

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

20 <211> 3318

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

25

30

35

40

45

50

55

60

65

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

gtgatgcgta	gttccggctg	ccggttgaca	tgaagaagca	gcagcggcta	gggcggcggt	60
agctgcaggg	gtcggggatt	gcagcgggcc	tcgggggctaa	gagcgcgacg	cgccctagag	120
cggcagacgg	cgagtgggc	cgagaaggag	gcgagcagc	cgccctggcc	cgtcatggag	180
atggaaaagg	agttcgagca	gatcgacaag	tccgggagct	gggcggccat	ttaccaggat	240
atccgacatg	aagccagtga	cttcccattg	agagtggcca	agcttcctaa	gaacaaaaac	300
cgaaataggt	acagagacgt	cagtcccttt	gaccatagtc	ggattaaact	acatcaagaa	360
gataatgact	atatcaacgc	tagtttgata	aaaatggaag	aagcccaaag	gagttacatt	420
cttaccaggg	gccctttgcc	taacacatgc	ggtcactttt	gggagatggt	gtgggagcag	480
aaaagcaggg	gtgtcgtcat	gctcaacaga	gtgatggaga	aaggttcgtt	aaaatgcgca	540
caatactggc	cacaaaaaga	agaaaaagag	atgatctttg	aagacacaaa	tttgaataa	600
acattgatct	ctgaagatat	caagtcatat	tatacagtgc	gacagctaga	attggaaaac	660
cttacaaccc	aagaaactcg	agagatctta	catttccact	ataccacatg	gcctgacttt	720
ggagtccttg	aatcaccagc	ctcattcttg	aactttcttt	tcaaagtcgg	agagtcaggg	780
tcactcagcc	cggagcacgg	gcccgttggt	gtgcactgca	gtgcaggcat	cggcaggtct	840
ggaaccttct	gtctggctga	tacctgcctc	ttgctgatgg	acaagaggaa	agaccttct	900
tcggttgata	tcaagaaagt	gctgttagaa	atgaggaagt	ttcggatggg	gctgatccag	960
acagccgacc	agctgcgctt	ctcctacctg	gctgtgatcg	aaggtgccaa	attcatcatg	1020
ggggactctt	ccgtgcagga	tcagtggaag	gagctttccc	acgaggacct	ggagccccc	1080
cccagacata	ccccccacc	tccccggcca	cccaaacgaa	tcctggagcc	acacaatggg	1140
aaatgcaggg	agttcttccc	aaatcaccag	tgggtgaagg	aagagaccca	ggaggataaa	1200
gactgcccc	tcaaggaaga	aaaaggaagc	cccttaaatg	ccgcacccta	cggcatcgaa	1260
agcatgagtc	aagacactga	agttagaagt	cgggtcgtgg	ggggaagtct	tcgaggtgcc	1320
caggctgcct	ccccagccaa	aggggagccg	tcactgccc	agaaggacga	ggaccatgca	1380
ctgagttact	ggaagccctt	cctggtcaac	atgtgcgtgg	ctacggtcct	cacggccggc	1440
gcttacctct	gctacaggtt	cctgttcaac	agcaacacat	agcctgacct	tcctccactc	1500
cacctccacc	cactgtccgc	ctctgcccgc	agagcccacg	cccactagc	aggcatgccg	1560
cggtaggtaa	gggcccggcg	accgcgtaga	gagccggggc	ccggacggac	gttggttctg	1620
cactaaaacc	catcttcccc	ggatgtgtgt	ctcaccctc	atccttttac	tttttgcccc	1680
ttccactttg	agtaccaa	ccacaagcca	ttttttgagg	agagtgaag	agagtaccat	1740
gctggcggcg	cagaggaag	gggcctacac	ccgtcttggg	gctcgcccc	cccagggtc	1800
cctcctggag	catcccaggc	gggcggcacg	ccaacagccc	cccccttga	tctgcaggga	1860
gcaactctcc	actccatatt	tatttaaaaca	attttttccc	caaaggcatc	catagtgcac	1920
tagcattttt	ttgaaccaat	aatgtattaa	aattttttga	tgtcagcctt	gcatcaaggg	1980
ctttatcaaa	aagtacaata	ataaatcctc	aggtagtact	gggaatggaa	ggctttgcca	2040
tgggcctgct	gcgtcagacc	agtactggga	aggaggacgg	ttgtaagcag	ttgtatttta	2100
gtgatattgt	gggtaacgtg	agaagataga	acaatgctat	aatatataat	gaacacgtgg	2160
gtattttaata	agaaacatga	tgtgagatta	ctttgtccc	cttattctcc	tcctgttat	2220
ctgctagatc	tagttctcaa	tcactgctcc	cccgtgtgta	ttagaatgca	tgtaaaggtct	2280
tcttgtgtcc	tgatgaaaaa	tatgtgcttg	aaatgagaaa	ctttgatctc	tgcttactaa	2340
tgtgccccat	gtccaagtcc	aacctgcctg	tgcattgacct	gatcattaca	tggctgtggt	2400
tcctaagcct	gttgctgaag	tcattgtcgc	tcagcaatag	ggtgcagttt	tccaggaata	2460
ggcatttgcc	taattcctgg	catgacactc	tagtgacttc	ctggtgaggc	ccagcctgtc	2520
ctggtacagc	agggctcttg	tgtaaactcag	acattccaag	ggtatgggaa	gccatattca	2580
cacctcacgc	tctggacatg	atttagggaa	gcagggacac	ccccgcccc	ccacctttgg	2640
gatcagcctc	cgccattcca	agtcaacact	cttcttgagc	agaccgtgat	ttggaagaga	2700
ggcacctgct	ggaaaccaca	cttcttgaaa	cagcctgggt	gacggtcctt	taggcagcct	2760
gcccgcgtct	ctgtcccggg	tcaccttgcc	gagagaggcg	cgtctgcccc	accctcaaac	2820
cctgtggggc	ctgatgggtg	tcacgactct	tcctgcaaag	ggaactgaag	acctccacat	2880
taagtggctt	tttaacatga	aaaacacggc	agctgtagct	cccagactac	tctcttgcca	2940
gcattttcac	attttgcctt	tctcgtggta	gaagccagta	cagagaaatt	ctgtggtggg	3000
aacattcgag	gtgtcaccct	gcagagctat	ggtgaggtgt	ggataaggct	taggtgccag	3060
gctgtaagca	ttctgagctg	ggcttggtgt	ttttaagtcc	tgtatatgta	tgtagtagtt	3120
tgggtgtgta	tatatagtag	catttcaaaa	tggacgtact	ggtttaacct	cctatccttg	3180
gagagcagct	ggctctccac	cttgttacac	attatgttag	agaggtagcg	agctgctctg	3240
ctatatgcct	taagccaata	tttactcatc	aggtcattat	tttttacaat	ggccatggaa	3300
taaaccattt	ttacaaaa					3318

<210> 2
 <211> 78001
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 2

```

10      cagattccgg gtctcatccc tagaccaaag atatctgaat catttggcga tgggtccagg 60
      aacctgcatt attcaacaca cttcccaggt gaccgtaaata gtcaaaagac aaaattacaa 120
      caaacttaaa catcttaatt ggcttcattc atgattctag aatcgggcaa gacttcattc 180
      ctcaaaatag cacaagtgtc ccaatgagct gagcagagga gggttggtttt atagacagaa 240
      aagggctgaa aaaagcagaa acaaagaaca aaaagcagat tgggtcatttc aaagttactt 300
15      tccttgtaag gcaggaacag ggaaacagaa caagagagaa ataactgatt ggtcgcattc 360
      gggtacttca gggtactttt tgttgtaagg attaaagcaa agggaaacttc attatgttga 420
      ttaaaacggg ctgcttgagg aatcaggggtg tgtatctctc ttctgatttt gtgaaagggtt 480
      atcagtctga tgatgtagaa ctttagcatg agtgactcca ttttgatttt tagtctagtc 540
      tggttagacc ctaatgccag aacttttttt gtttgtttgt ttctgctctg ttgccagggc 600
20      tggagtgcag tggagctatc ttggtcact gcaacctctg cctccagggt tcaagcgatt 660
      ctctgcctc agcctcccaa gtagctggga ttacaggcat gcgccaccac gcccggttaa 720
      tttttttttt tttttttttt ttttagcagaa accgagtttc accatgttgg tcaggctggt 780
      ctcgactct tgacctcagg tgatccacct gcgtcggtct cccaaagtgc tgggattaca 840
25      ggtgtgagcc accacaccca gccctttttt ttcaagacag ggtctctctc tgccacccaa 900
      ggtggagtgc agtggcgcca aaacagctca ctgcagcttc cacctcctgg gctcaggtga 960
      tcttcctgcc tcagcctccc cagcagctgg gcccaccac accggctaata tttttaactt 1020
      ttagtagtga cgaggtctga ttctgttacc caggctgggtc tggaaactcct ggccccaaga 1080
      catccgctg cctctgcctc ccaaagtgtc gggattacag atgtaagcca ccgcgcctgg 1140
30      gtcctatga tttttattta acataatgca ccattggaatt tgtgctctgc ttagttcagt 1200
      ctgagcagga gttccttgat acttcgggaa acactgaaaa tcattccatc cccattcatt 1260
      cattcctgca gcacccaagt ggaaattctg cgtttcagac agggacacta cccttagaga 1320
      gcagtgggct tcccagcag cgtagtgaat catgatactc ctgagtttca tgaaaaaagg 1380
      gcagacatct ggccagagct gggaggcagg aaatagagca cgggtgccctc ctcccatact 1440
35      ccagcttggg ttaactgaggc tggggcccag gccctgcagg aaaggaggtg catgactact 1500
      ttaaggccac tcaactctgtg actcaacggg ccgggtcggg gctggaactc aatgccctcc 1560
      cgggcctgga gagcccacgc gccgtgggcg gggctcccgg ggtcgcctag gcaacaggcg 1620
      cgcgcgcgcg ccgagcccag agcccccagg cggaggaggg aacgcgcgct attagatata 1680
40      tcgcggtgct ggggccactt cccctagcac cgcccccggc tcctccccgc ggaagtgcct 1740
      gtcgaaattc tcgatcgtg atttggctcct ctgcttcagg ggcggagccc ctggcaggcg 1800
      tgatgcgtag ttccggctgc cgggtgacat gaagaagcag cagcggctag ggcggcggtg 1860
      gctgcagggg tcggggattg cagcgggcct cggggctaag agcgcgacgc ggccatagagc 1920
      ggcagacggc gcagtgggac gagaaggagg cgcagcagcc gccctggccc gtcattggaga 1980
45      tggaaaagga gttcgagcag atcgacaagt ccgggagctg ggcggccatt taccaggtgc 2040
      gggagcggcc cggagcgtgg cgggcccctc gcttaggccc cttgaacatc ccctcagacc 2100
      tccaggcccc agactccctc tgggtcttgc cctctgcctc gctcctactg cttgaggatt 2160
      cgatgggaca gcgacgcact gcgtccccc accctttgtc cccggggcgg gcgtgtttct 2220
50      cgccgcagcg tcggagcccc cttcgatccc ccacctccct tctgttctcc agctcgggtg 2280

```

5	atctctcaag	ccggggggacc	gccgggtctgt	gctctcaacg	cgaatccctc	gcaccccgac	2340
	ccccccccct	gcctgtccac	tctttgtccc	ctgggggtgat	ttagcacccc	cactatttcc	2400
	ttttctggag	tggaaccacct	cagactctct	tcctttgtct	ccctggggga	aaagggttact	2460
	ccccccgctc	ctccttcaca	tttcctttcc	cctagtctca	gtgtgcgtcg	agtcccagag	2520
	atgacagtcc	cctttccccc	ttctgttcat	tcattttattg	gataggagtt	ggcaagctta	2580
10	ttctgtgcta	ggcacocgctt	aggcattgga	ggtgggtgttt	gctaatacagg	acaggcaaga	2640
	tcctagcctt	agtggggcct	agagtcgaat	agggcaatca	aacacaaaag	caaataattt	2700
	cagatagtga	caggtgctgt	gaagagaacg	acttcctaac	ggggtacagg	gtgactgcat	2760
	agaaggcccg	ctgtcttaga	gaaggggatc	agggaaggcc	tgtcaaagga	ggagacattt	2820
	gctttgtgag	ctgaaccaag	aggagcagaa	agccgtgaga	atatggggct	aaagaacctt	2880
15	ctagccagga	ggcctgcggt	acccactcca	ttggggccat	gatattattc	tttcaggcag	2940
	ggactcagga	agggttaacgt	tttaacccctc	tctaaaatag	catctttcct	caatgagcag	3000
	cttagtcttt	ggtcgtggca	gagatgacct	tgtcttagga	gtcatctcct	tgtgtgttaa	3060
	aaagttagga	aaggagggtt	tctcatatat	ctataaaaaca	agtagttaaa	aacacaaaga	3120
	gctcttcctt	tcacaagcag	ctgaataaga	tacatactcc	caattaaatg	tcattgcggg	3180
20	ggttggttaag	attaactaaa	accacacttg	cacagtatct	taaataagcg	atatacagaa	3240
	tagagagatt	ttgttacttg	tgtaaaggga	gacagcagat	gattctgttt	tcagcttata	3300
	ggctcaaaaag	gcaaattgtg	agatccatca	gctgtagtat	taaaatctat	tttgagctcc	3360
	gcttagaaaag	gaaaaaagggt	ttaagcagtt	cttttggtatg	cttgactaac	aaaagccttt	3420
	ttttttggca	gccttgattt	tcattgtgat	ttacatcaag	cttatttgac	aggattcttt	3480
25	ttatttggtac	tgtagtgtgt	atattagttt	ctgctagact	aatatttcta	accactgtaa	3540
	tctatatact	aataagtatg	attgatcagt	atataaaaatt	tgtatgccat	atctgggtctc	3600
	tgaattagct	gaatgaattc	cataagggac	tttgagactg	tgtagacaaa	ttttctgcat	3660
	cagtttaatg	cagtagagtc	taaaatgtct	ttaaatgaaa	attggttggtc	tgaagtgttg	3720
	gagttgatta	tgatacaccc	catcacagtg	gaagcattgt	ggagagaagt	ttttccact	3780
30	gaaattgact	gagttgacaa	caagaaatc	gtattgtaac	ttagttctta	gttgaatttt	3840
	atcttctaca	attttaagcc	agagtgggtt	gacctgtcac	ccaagcatgg	ttaaaattgt	3900
	attcagcatg	caactagcat	ggagtgtgtc	agtcttcaat	tcatttcctt	cattgttctt	3960
	aagtttttct	gccacaatta	aacccacaaa	gttagtcaag	gtgttgagat	tttccactgct	4020
	tcttaatgga	ttgccacatt	ccctgaggta	gtttcttttg	gtcttagaga	attgtcaggg	4080
35	ccagcttttc	tcacctccac	tgtatggata	tttttctttt	ctaagatctt	gaaatcagaa	4140
	gcttttctcc	taagtgtaaa	agtagctctt	tgtcatacaa	ctgtagcgtt	ttctgaaaca	4200
	gagttcagat	gaccttgagt	ctaaagtggc	taactttcca	aggtgtgtat	cgctttacca	4260
	aaaccattat	ttttcaagga	ttcaaagaat	gtgtttacaa	ttgatagaaa	atggaagttt	4320
	aaaaaaatta	atactttata	gcatgttgaa	atgagggcag	ccttatacaa	agtcatactt	4380
40	tgagcttgcc	tagcctattg	tgatcagaga	ataatgtaat	ttttgcttac	aacttggtaa	4440
	gcaggtcagt	tattctaact	tattttctga	ttagaacaaa	aagatgtaaa	aacttgaaaa	4500
	ctattgggaa	aagaacaaaag	agtgaagagg	acttttgagt	gctgaggaat	gtggcagctt	4560
	ggaaaaacaaa	cttttttaggc	agagattctt	tgctaggtca	gtttgataaa	gtgagcataa	4620
	ccgtattttt	aatcttttaat	gctaattgaat	agcatagatg	ctaataagca	cttaaggtcta	4680
45	taaaaagtca	gctttgatag	tgtatataga	tggttttaaa	cattgttttc	tagcatttta	4740
	acactttcaa	atcatccggt	tgcttgattg	ggcctagctg	tctaagagga	gagaatgagc	4800
	ccagatgagg	aaaagagatt	gattttactg	agctagaatg	agaggagaga	gggttgagtg	4860
	aatgaaaaga	atagctcatg	tgctccctc	catctgtagt	ttaagagggg	ttgggtccgg	4920
	tgttttgctt	gttttctcgt	ctgtaaattc	tttgattctc	tgacaccact	cactatattt	4980
50	cattgtgaat	gatttgattg	tttcagataa	aggggactgc	aataatacct	tgtgacatga	5040
	aggcaagatt	tattcatggt	agaggcaggc	tttgtaaaat	gggccactct	tccaattgac	5100
	atttgttttt	atagctgttt	tcattatgaa	atacaatcta	atgcctgact	aggttaaaaa	5160
	catgttgtaa	caatagttca	ctaaaattcc	ttactgatat	acagcttatg	ttgttatatt	5220
	ccaaaaagat	gaatattaaa	atgttgccat	aatgtttatt	taaatactat	tttcttcaga	5280
55	ggaaaaaaaa	ctatttttatg	caaaggagaa	agatctatac	actatgactc	acttcactta	5340
	aaaaaaaaaa	gactaacgga	aatgacatgg	agagactggg	aagttctagt	catcttgagt	5400
	gaccatttag	atctaaatgt	tcttgtttag	ccctgggttg	agtgaactaa	atttaggtgt	5460
	ctgatcagta	ctttggaaat	ggtgtaaatg	cctttgtaat	tgtctggact	gatattagat	5520
	taactgggag	cacaagtaga	aatagtgaag	gaaagaactt	tttgctattg	ttatttgaca	5580
60	tcactggcat	atcttatagga	atactttggt	gtttttggaa	gtaagttaac	caaccagtgg	5640
	ttctaaaaag	tcagctgggg	gataatggta	atgccgctgt	ttcttagctg	caagttatct	5700
	gccgttactt	ctcctccatt	ttgcatttta	tcttgaaatg	ctcctcaaaa	cctattaaaa	5760
	tacctggtat	tgaataatgt	aattgaaatg	gtactgaatt	tcacagtggg	aatgaataag	5820
	aaatttcctg	tggagggtttt	ttgacttagc	tactgaaata	acggcctttt	gttgtgtgat	5880
65	tctttccctt	ttctctttgt	taaagaaaac	tgtcttgtga	tcttgtagat	tacagaatcc	5940
	ttttggcaat	ttctgttctt	agcactgctt	ttctttcttt	tctttctttt	aaatgaaat	6000
	ggggttttgc	tgtgttgccc	agggttggtct	tgaactcctg	gcttcaagcg	atcctccac	6060

	cttggcctcc	tgaagttggg	attgcaggcg	tgagcaggta	ctttttctga	ggcctgcctg	6120
5	agcctatata	tattttgcac	aattttggcat	tcctccctac	agtgtttatg	ctgattttgtt	6180
	tctggtaaca	actaatactg	gcaaatcggc	tgggcatgtt	actttatgct	gccccatattc	6240
	aggaaaattg	gaattctagc	tgggtcattg	ttcccagatg	atgtagtttg	gcaccagcca	6300
	ttccatgttc	acattttgag	tatccaggag	ggctggggac	tttggagtag	ttggtgattc	6360
	cctctgccac	atttcactgg	ttggtcacta	tggcatcctt	tccaccacac	tagtagtcta	6420
10	ggttctcaga	tggttgcttat	gagcctgcaa	tggtttctag	tttcacactg	cagaaatgag	6480
	tgaagccggg	tacccgttaa	tatggtccca	tcatacactag	agtaattcat	tgttctaaaa	6540
	ccagatctga	gtctctcact	cctctgcaac	tacttctgat	tctttcataa	cacttgtaaa	6600
	gtccaaactc	ctcttttagca	tggcagccag	cttccagtc	ttccctccta	tgtggcttcc	6660
	attctagcca	gacaagaaa	ggcagcgttc	tccaaactca	tcctcgccct	tcattcctct	6720
15	ataccattgc	tgagcacttt	gttgaggatg	cctctcccgt	tcaatctagc	ttgcatcttc	6780
	cagctcgaat	gtgtgcttcc	ttgcaccaga	gttttggttc	gtcacctgtg	tgttttcata	6840
	caagctggca	catatctctt	ctaaagccct	gctgtcattg	tagctgcgtc	tttacaaca	6900
	tttttttttt	aaatttttat	aaagtcaagg	tctcactata	ttgccaggcc	tggtctcaaa	6960
	ctcctgggct	caagtgatcc	tctgctcttg	gcctcccaga	gtgctgggat	tataggtatg	7020
20	agacactgtg	cccagctgta	gtgtctactt	tatatcccag	gtctatctcc	aaacttgagc	7080
	aagcttcctg	aggccacctg	ttgtatcttt	ctcattcatc	ttgaagtcct	ctgctcctgg	7140
	cacagagtag	gtacctaaaca	agagttggga	ttgaattgat	ggtcagtagt	ttgctagcct	7200
	gatggtataa	agatgtacaa	aacatgttcc	tggctcccac	tctagggggg	caatgatgga	7260
	aacaaataga	ttagcccaca	ttagtaccaa	tagtagaggt	cactctggga	gaaggccccc	7320
25	accacatttt	gagtcattgg	ctaatgaggt	aatttagtat	tgccctgctgc	agtggctttg	7380
	gaagaaaggc	tggcatttctt	agccagtaga	agctgatacc	actgatttgt	ttcacagaag	7440
	ctttaaatat	aacaataaat	ttgtgcttgg	cctacgggtga	actttacagg	caacttgagc	7500
	gtaatatgtt	tgtctctcta	agaattgttg	aattcctctt	ccctcatccc	tcctgactgg	7560
	ttctcacaag	cctagcgggc	ctttgcatgt	ggttgggtca	taaaatactt	tttgattttg	7620
30	ggatataaaa	tatagttctc	cataaaataa	cgactgttac	caagtctttg	attttttttt	7680
	tcaaactata	aatggtaatg	acattctttg	gcctttgatc	agaccacctt	taggggcaag	7740
	agagtagttt	catgttttgc	tttttctagt	gtcccctgtg	tctgggtata	gttgacgtct	7800
	cagctgtcat	actaacagtg	ctgagttagt	cccttacttt	ctttgggttt	tggtttctcc	7860
	cttgtaaaaa	tgatcctgga	ctaactgata	ctaaagttca	ggtcaagtaa	taaaaatcct	7920
35	taatgtactc	acaaatacaa	tttaatgttc	ctgaataatc	cttgtaaaaa	ctgcagcagt	7980
	tactcagttt	tgtaaggtgt	ggttgggtac	tatttaggtc	aaaagtttat	aggagctttg	8040
	tgagtatagt	taacaactca	aaagaatggg	gtgttttttc	ccgaggggca	tgaaatgttt	8100
	ttgataaata	gagttcattt	gacttggtaa	tgtggaaaat	gagtagccct	gacacgtacg	8160
	ctatgctttt	gcagtttttc	tctcaagtag	caattgggtg	gcttttctct	taaaagatag	8220
40	aggaactgat	tcttgagaat	ttacgaagc	ttcaacccta	actaggtatg	caaagaatag	8280
	ttgcccttta	tggttgtaatt	ttaggaagaa	acctacatct	ggtctaagtt	tcatttgaat	8340
	aatatgatag	tttacacatc	tgccatattt	gagaagaaag	tacctaaagt	tccagcattt	8400
	tagaaataat	gctttacttt	gtgtagaaat	ggtcttttag	gtttaatagc	tgctgccctc	8460
	tcctttttca	aagcagcttg	acataatcat	gagtatcttg	ctgacagctt	gtaaattttg	8520
45	attgtatgaa	aactgaaaat	aagaccattt	cacatggaag	attccctcct	gccctgaaac	8580
	agccaaagaa	aactgtagcc	atcaaatcta	ttgatctctg	ggctttggta	caagtccac	8640
	tactacaaat	aaaataatac	caagtactta	taaatgattt	tcagtccttt	taaagtttat	8700
	tttttttaata	ttttttttga	gatggggtct	tgtgtgtctg	tccaggtctg	agtgcagtg	8760
	cacaatcttg	gctcactgca	acctccacct	cctgggctca	agtgatcctc	ccacctcagg	8820
50	ctcccaagta	gctgagacta	caggcatgtg	ccatcacgcc	cagctaattt	ttgtattttt	8880
	ttggagtaga	gatgggattt	tgctgtgttg	cccaggctgg	tcttgaactc	ctgggcttaa	8940
	gccatctgtc	tgccctcaggc	tcccaaagtg	ttgggattac	aggtgtgagc	cactgtgccc	9000
	ggcccagccc	ttttttttaag	agaaaaacgt	atgacatcgt	tcgatttact	gagtgcttat	9060
	ggttttacta	aggcagtaag	gttttatgga	taccctatgg	taattagata	gaattagtc	9120
55	tctgaagtca	gctctgtaat	atggactcag	agtaaactg	gcaaagggac	acttaaggct	9180
	tgcattttct	ctgggaaata	aacgtattct	ttactactct	gaatctagt	ctgggaaatt	9240
	ctaaatcctt	cttgaggatt	aaccacttga	agtaaagttt	tgggtcccaa	gtaggcttgt	9300
	gtccctgtct	ccttctcttt	acttttcaga	tgtttcttcc	tagagactga	ggatattttt	9360
	acttttacag	atgaagaagg	aagcctcggc	tgtgtttgtg	gcttttgtgg	gtgagcaaca	9420
60	tcacttgcaa	agataagatg	agcatagcaa	aactaggctt	tcaaaataat	tttttaaaat	9480
	ttcttagtga	ttagaaaagg	aaaactcttc	ccttgtctct	gttaagaaac	gtttttcgac	9540
	ttttttcctt	tcttaatgga	tcttttattg	gcacttctct	tccttttgca	gaatcttact	9600
	taaaagtcac	tacgttacat	tacagcaaac	agcttagcta	atttttatcc	agatgggccc	9660
	cgggttacagg	attgtacact	attgcgaatt	tottacagga	aagtgaacat	caagtaatta	9720
65	ttccaaatag	agttctctta	agaacgtgag	ttacttaaaa	atgtctaagg	atgaagtcac	9780
	ttctgaatat	aacttcactc	aagagaacaa	ataagcaaac	tgcatttagc	ataacatggt	9840

	aaattagctt	taactctcct	tgatgtttga	acatttgtcg	ctgttaacta	ctgtttcact	9900
	tttcaaatag	tcagggctta	gtttgcttct	gtaaggataa	agggaaaata	cgccttcact	9960
5	gagtcataaa	tattttttgtg	gctaactttt	gcacagagaa	aagaggcctc	taagaaggta	10020
	cccagtgaat	ttttttttcg	gggcaggag	agaatatgtc	attttttggt	ttgttggtgt	10080
	tggtgtcatt	gttttgcttt	gtttgtttta	ctctgaactg	aactgtatct	tgacagcact	10140
	tttgaattaa	gagcattact	cttattgttc	tctactacct	ggacgccacc	tcctgtttgc	10200
	catagtgtta	aggatcatgc	tccgaggtgg	ggtgaggcag	aatggggcca	agatcagaaa	10260
10	gttacattaa	gctacatcag	gtttatacaa	gcataaaacc	aaatttttgg	agcagtcacc	10320
	agaatacaac	ctggtttagc	cacacctaata	ggttgctcct	gaatattcct	tgagaatcca	10380
	catccctaga	atgctgggtt	tcaatgggccc	ctttatgtac	ctatcatggt	gtcattttctg	10440
	agcattttcta	aatattcctt	catgtottac	tgacagtttt	tcttgaataa	atcttaggaa	10500
	tattagtgcc	attatcagta	ttttgtttgg	tctgtttcaca	ccacaaataa	ctaccaggt	10560
15	ctgctacttg	cccctatttc	tctacctgct	aatgaaaatg	cttttgaaag	tttgagtaac	10620
	agtattggag	tgtgcacagt	ggtattggta	ggttctgtac	tcatccttaa	ccacttgttt	10680
	tcaccccttg	tgagcttgaa	gtttctccaa	aaaattttatc	acaaaactta	tcagacatag	10740
	ttaatacact	cagagagaga	atcactgaaa	aagtagatgt	agtttaacaa	accagtgcc	10800
	ttttttttac	ccatgaatac	atatttgtca	actaaacctc	attttgcaac	ttgttccact	10860
20	actogaatgg	taacaaactt	ttggtttccc	aatagatttg	gaagatgttg	cttttgaaag	10920
	taggaaatag	atggctttag	aagatggaag	aatattttgt	ttgaagtggg	agcgtgggtat	10980
	gtccttagct	gtctgtgaaa	tgacagtgaa	gatgggtgtg	ggccttcate	tgcatttccc	11040
	atcttcagtt	tgaggaggtg	gttacccttc	taaccactta	agaactgcat	ggtacatgct	11100
25	gtttttattta	cagggcaaaa	ctgtgctccc	gtagtttccc	tggtgcttgc	cttcacgtta	11160
	acacagtgct	atcgtttggc	agtgtttatg	tgccagggtc	catgttagaa	ggaggaaagg	11220
	tatagcgaag	ttaaagggtg	cagttggcct	cccaccttta	gttttgtaag	tgcccttaaa	11280
	gtttgatttt	tgtagggtga	tcataaggaa	gtgataagta	tgttaggtta	tttgtggttt	11340
	gagctaattt	tagtctcttt	ttacagcttg	ctttgtatcc	tttgccatta	aaacatgctt	11400
	tctagaaga	caacttttga	atgtaggaca	cagctctat	tctatacttg	gctacatttc	11460
30	aaaaaatatt	ttctcagtac	tttggaaagt	ggacagttgg	aagcatagtg	acagttttta	11520
	aaaatctttg	attccggccg	ggcatggtgg	ctcacgcctg	taatcccagc	actttgggag	11580
	gcccagggtg	gtggatcact	tgagggtccg	agttcaggac	cagcctgacc	aacatggtga	11640
	aaccctgtct	ctactaaaaa	tacaaaatta	gcccagcgtg	gtggtacatg	cctgtaatcc	11700
35	cagctactca	ggaggctgag	gcaggagaa	cgttggaatc	tgggaggcgg	aggttgcat	11760
	gagccgagat	cataccattg	cactacagcc	tgggggacaa	gagtgaact	ctgtctcaaa	11820
	aaaaaaaaaa	aaattaaagt	atttcttttg	tttgtgacac	ttctactttt	ccagcaagta	11880
	aattataatt	tttcatacag	gtatgaaatt	cttggtccaa	gctagtgggt	aaaaaggcac	11940
	agttgatatt	agaggatttg	taaaagatta	tgaccacgcc	tgcaatgtac	tgaagcaagg	12000
40	ctttgctggg	ctgtgtatag	gaaacottcc	ccagcctgtg	cccttgcttg	atagaacatt	12060
	ttgctcctaa	gggtaggtgc	ctgtatctgt	ctccagtaact	ggtagttttc	acacagaaca	12120
	gttgtgtttc	agagctttag	tctcaagctg	ccctgctccc	ctgaagcagc	caccctgagc	12180
	atgtgcactc	acaggagggg	acatgtgagg	tcatggaaga	agacgactca	ggaagaagaa	12240
	gaottgggtt	tgggttctga	ctctgccttt	gactgtttgt	ggattttgag	gagttgcata	12300
45	caggactctgt	aaaatgtagt	cattagacta	gactagacag	ccatatagca	ttacctagat	12360
	gtaactttct	acaaagacat	ggtcacagga	gaagaccaga	gggtgggggtg	atctttcttg	12420
	aaaaattggg	gcttcatgcc	ttactcatgc	tagatatggt	agcattatat	ggctgtgcct	12480
	gatcccccta	atctaaaagt	gggacagaac	tttaaaattt	catattaact	caaattaaaa	12540
	cttgaaaaaa	accattattt	tccttaaaaa	taataaaatg	ccctgtgggg	gcataagtca	12600
50	cattatattt	taaaattcct	gaatgccaca	tggatgaatg	tagttccttt	tgaattcctt	12660
	cttttgtcta	aagaggaatg	ttggattttg	taattggact	aaaaaatctt	ccatttgaga	12720
	gagaaacagt	ctgctgcatg	ttctaccctt	gttcaggata	aaacccacta	atagctaaca	12780
	tttattgaat	tctgtgttgt	gcctcaggca	ctgtgcaaag	tcctttacat	gcaatgctgt	12840
	ttattatata	ctgtcaattg	gtctataaca	gcaggaaatg	tttcaggagg	acaatgaggt	12900
55	cccagaccct	cagtcttctc	ctgtgtcctg	gattcagctt	cacaatagca	ctatggcagt	12960
	gtggccactg	cttcagcttc	cacatacatg	gctgtgaaga	gagacagggg	attgtgctaa	13020
	gcctccccga	tttattagga	cataggagga	gagagtttgt	agtttttgac	ctttgcctag	13080
	ttttctaacc	tctttcctag	atgtcacaaa	ttggccaccc	acagtcatat	tttgcttgct	13140
	tcacgcaatg	cttttttaaaa	aagagaagag	tttaatttgt	gccattgttt	ataaatgaat	13200
60	caggagaaat	gacatgcaac	tctggattct	ggcctctctt	gaaaaatctg	aaaatcacac	13260
	ogtctgagct	tacactggca	gtggtctgct	ggactgaggg	acacaactcc	ttttggatgt	13320
	acatgtgtgc	gttgacaggt	ttaccacagt	cccacagtg	gtcacactgt	ccttctcggt	13380
	gtacactacc	tagcacttga	gtttgcaacc	cctaccccaa	gctgagtttt	ctcgtcaagc	13440
	ttgatgttaa	tgttatgtga	tgcttggcct	tgtaggtatt	tggtatatta	tcgttagata	13500
65	aaattgaagc	aaagggttaa	aggggttggtg	gcctgaggga	gtgcccttga	cagtaaagtc	13560
	taggataaaa	tcattggcca	ggtactcctt	cccttcccgc	ccttcctctt	ttctctttat	13620

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

cctcagcctc cttctgctat tttgaggaag ttagaagcca ccaccatttt ttcccacctc 13680
aggcaactga gtgtggctgt atttctgtcc catgttcagt tatttccagg aactattttt 13740
gatgaccaac ttgaagttac attgggtggg cctaattggg gctgataaaa gaatgagggtg 13800
accaaatatg cttgcactga gacggctacg aagtaagggt tttaatgact tgctttgtga 13860
cttggctcagg agtgatacca tttgtcatgt gtccaacttc atgactaaat ggttgctcta 13920
ccttatcctc atagctataa taaaataaaa taaatacata cattgcaggg aggaatgtat 13980
cttggttaaag gtctctccct tttagcaaca aaagtacata ttatgttgta gaacatgctt 14040
tttctttgat ccttcttgaa cacctattac tctatagagg tatgttggtg atggcaaat 14100
agaacaagca atagataagg atgattcttt accattataa ccagtcagg gtctttgtcc 14160
taagttttgt acctttctcc agagggaaag gtatttgtat ttattttatt atttttgagg 14220
cagagttttg ctcttggtgc ccaggctggg gtgcaatggc acgatctcag ctactgtaa 14280
catccgcctc ccgagttcaa gtgattotcc tgcctcagcc tcccagtag ctgggattac 14340
agggtccctg cagcatgccc ggctaatttt tttttttttt tttgtatttt tagtagagat 14400
gggttttcac catgttggtc aggtctgtct tgaactcctg acctcagggt atccatccac 14460
ctcggcctcc caaagtgttg ggattacagg catcagccac tgcctccggc cagggtatttg 14520
tatttttagt ctctatgcct taccgtctca gatcaggagg atttggtgat ttatcgaatg 14580
tggtgggaagg ggaagaagag gaaacgggag gaatgttcca gattagggaa atagctagat 14640
ggaagatgca gccctcatc aaggtgggga cacaggaaaa ggaacgtgtg caaagaagat 14700
ggtgatctgg ttgtgacct gttgttagag gactgccagg gaagcatctg gtaggtggtg 14760
gggtgtttaa atatagaaca ttccggagaat gctccgaagc ttcagagAAC ccttcccaaa 14820
aggacaaaac cagctcagtg ttttagcact ccgggatcat atggcatgac agcatggctg 14880
ctttatactt ttttgtgtat gtgaaattaa aaccaaccac tcaggaccaa tttctctgaa 14940
gctttttgtc aatctttcat ttgcttttct cgtctagatt gtaagctcct tccagccagt 15000
gtctgttgat tcagtcattc aaaaaataat acatgaacag ctactaggta ccaggctctg 15060
tgctgggcag ttgggatatg ttggtgaggaa gacaaacttg gtccctgccc ttaggaagtt 15120
cagtagtcca gcagacaaag tggctgaata aagataatct cagttcacag tgataagagc 15180
tcttacaggc ctaggctcca ggtgctgtgg ggatgctcag gaaaagggtat ctaattggga 15240
ttgggagcag gcaaaacaaa taaaggatag tgtataaagg taatatctag ttgaagttct 15300
gaagggcaag gaggagtga cctgtatatt ctctgagtc ctccctaact tgggattgac 15360
ttctgtccg tctctgttca tattaagtgt cacctaggct tgaaaggggt agatcatatt 15420
tcacttctct cctctttggt cttaaccttt ctctgtacc ccctcacaca atgcatatgc 15480
attattctct tattgtatat atttttctct tcttctttt catgtttcct ctgccattac 15540
ttttaacctc gactgccata tggccttgag ctcatgcgac ctctgagtc aggcattctg tagtggagg 15600
tattccatca tggccttgag gtttcattgt aaattttgta gccctagaac accaacaaca 15720
gtgcacagta attagtaggc aggcagtaca ggattcattg aagtgaagtg ataactttta 15780
tccaagtatg tatgcagata atctttgatt tgtacaaaaa aaattatatt ttaatatgta 15840
aagatttttt aaaagaatct tcaagtttta gccttccac taggaatata ttgaaaacat 15900
gtgcctagtt cactgacttg cagctgccac tatgagaata aaggtctcat ttagttgttg 15960
tgaattttta gggatatttt caatgatgtt ggctggttta tcccatatg ttggtctttt 16020
tttttttttt tttttttttt gaggtggagt ctcgctctgt caccagggt caagcgattc tgctgtctca 16080
ggcgcaatct cgactcactg caacctccgc ctcccggtt caagcgattc tgctgtctca 16140
gcctcctaag tagctgggat tacaggcgcc tgcactacg cccagcta at ttttggatt 16200
tttggtagag aagggtttca ccatgttggt caggtctggtc tcgaactcct gacctcatga 16260
tccactcact tcagcctccc aaagtgtgtg gattacaggc gtgagccacc atgccagcc 16320
tatgtgctct tattagcaat totcagtaca cagatagctt tgagtgatcc tttcaagtca 16380
agtaccttat taaaaaactc aagtgtactg ataattatct tacttttaaa tggctaagt 16440
ataagactga attttttagt actgtaacac ttcagattac agattctgat atttttatgg 16500
ttatttatat ttattttatt ttgagatgga gttttgctct tgctgcctag gctggagtgc 16560
aatggcacga tctcggtcca ctgcaacctc cgctccag gttcaagcga ttctcctgcc 16620
tcagcctcct gagtagctgg gattacagtc acccgccact acagccggt aatttttgtt 16680
atttttaata gagacaatgt ttcaccatgt tggccagggt ggtctcgac ttctgacctc 16740
tggcgatccg ccgcctcctg cctcccaaa gctctgggatt acaggcgtga gccaccgcac 16800
ctggcctggt tacttaaat taaatacaaa aattatgttg attaatctg aatatttcc 16860
tgattgctcc ccgtttacca ttcacacatt tattaaatc ttcgcttgcc atatagaagc 16920
agtctctctg ccatatatgc catatagata acagaactag ctgtctgcaa accactgaaa 16980
ttgtgaaaac atctccctt ttttctgtt tctaattcta gctatgagga ttatatacag 17040
aagtagtctt ggatttgatt tttttttttt ttgtatgatt gttttttgat agttgttgac 17100
tacaatatcat ttaaacgtct gaaaggggaa aggttttctt taaaatgga tgacaaagga 17160
gaataaaaag gtattttgac tatttttttg aatgatgagt ttttttttct ctttcttgt 17220
tttcttttgg agtcatttat gtgtcactga gtggatacca tggaaacatg ggcagaagta 17280
gatatatggg gtaaaagaac catagtctat aagctccttg acagaatcac tgaagtgtag 17340
ccgttatatg gccactgtcg cagggggagg cagcagtttt gaagaagggg atgagtaata 17400

```

	atgagtgata	aaaagggcatc	ctggatagaa	gaccaaactc	tgcagaagac	cccagtttga	17460
5	ttatgctttt	gttttctgat	ttgcggagga	gagtgaaaat	gcctgagggg	tgcgggggag	17520
	cacatagggt	gtatgtgtgt	gtgtgtgcgc	gtgcagattc	tctctttcac	tgtatgtatt	17580
	tgtatgcatt	tatgtatctt	aggacttaag	ctttctagtc	aataaattgc	catagtgggg	17640
	aattgcttaa	ttgcttgcc	tctgttgttg	tattttaatt	aatttttatt	ttaatgattt	17700
	ttttgggtgg	gtacaggggc	tttaactatgt	tgtccaggct	ggtcttgaac	tcctaaactc	17760
10	aagtgatcct	cccgctcgg	gctcccaaaa	tgtctgggatt	acaggtgtga	gccaccatgc	17820
	ccagcttagt	tgtattttta	atgggcctgt	ttgcagcatt	ccctactccc	cttagtttac	17880
	ctggctcaca	acctgtcttt	ccatatcaag	gcttctgtca	cccctggccc	atgtcagtcg	17940
	atttgggcag	cccacccagc	atcatcacct	catgtcccag	ggaacttcct	gttctctctt	18000
	tccagctatt	tccttccctg	gcagttgaga	tagtctctac	ctttgacctc	ctgttaagct	18060
15	cagaccttct	gctctctagt	tacagcctct	gtgctgccag	attccctcgc	tcagttgctt	18120
	tctctagttt	gggttttctc	ctttattcag	atttccagct	gtttctctcc	tccccccacc	18180
	gcagcctcct	cacttccctc	cttatgcatt	tgagactgtg	gtcagtcact	ttagatgctg	18240
	cctctccact	gtacttgtgt	ccatccacc	acctaccacc	tctagccctg	gagcaggctg	18300
	ttccctgtc	tttgtcttcc	tgggcccagg	ctcctaagcg	ctgctggaaa	aaaaatcccc	18360
20	cagtattgag	cccctagaaa	tccagtcctt	aatcccaaat	ctgtctcccc	cagcatctgg	18420
	ccatcagatc	taaagcttac	ctgccatcct	ttccacctca	tttctctcac	aggggaaaag	18480
	gagcctttgc	tcctagagtc	tgcgctcctg	accccttccc	atctcacctg	ttcaaggcat	18540
	cttgcaataa	ggggttggtg	actctcgagg	aatggatccc	aggccctccc	tattatcatc	18600
	ttatgtatgc	cagttcaacg	ttctcagctt	cctccagccg	agacggcccc	tccagccact	18660
25	gctttatact	ctccttctct	ggttgaaatt	tttgaagtaa	ataggtcact	ctgcccactg	18720
	ttcatcttcc	agtcaactct	tgtgtttatc	ttccagggaa	gtgaggctct	atgctaccaa	18780
	gccactgaaa	taattttttt	ttttttccag	actgagtcct	gctctgtcac	ccaggctgga	18840
	gtgcagtgcc	gcagtcttgg	ctcactgcaa	cctctgcctc	ccggcttcag	gcgattctcc	18900
	tgccccagcc	tcctgagtag	ctgggattac	aggtgcctgt	catcacgcct	ggctaatttt	18960
30	ttgtattttt	ggtagagatg	gggcttcacc	atgttggcca	ggcttgttgg	catgttgacc	19020
	atggttggcca	ggctagcctc	aagtgatcca	cccgtagccc	tcccaaatgg	ctgagtttac	19080
	agggtgtgagc	caccgcacct	ggcctgaaat	aattcttgac	aagatctgct	tccttgtttac	19140
	taatacagtg	gataattttg	atcctaattt	taatgcagtt	cagtgtggta	gacctgtatt	19200
	tgcataattga	atattccctt	ccctgtttta	ataactctat	tttttccctt	tcttttatat	19260
35	ctcctgcttc	tctagctagt	cctagacctt	actcatcggt	gtcttctctg	ttgtttctct	19320
	aaacttgagga	gttcctacag	ggtttaccct	atctgctgct	ttcatttagc	ccttttgttc	19380
	tttttgagcc	atctcattca	ctcaccaggg	atgtagcatc	ggcccttgaa	ttcagtgctg	19440
	acacatacac	tgtgcactat	gggacagcct	tcagaggcac	tttgttccct	aaattgtggg	19500
	ggtctttgcc	tctcatggag	ccttgcatat	gctgtttctc	ctgcctggaa	tatcctacct	19560
40	tttacttaac	tgattctcgt	tcttctttcc	agtcacattt	tgtacatttc	ttctgggaag	19620
	ctttctctga	tttccctctt	ccacaggtcc	aagttaactg	ccttgtctag	gtcctcccat	19680
	ggccctctga	aggcctcctt	tcatagcacc	atgtctgagt	atactgtaat	aacacgcatt	19740
	gctctgtaat	agcctgttta	cttacctatt	gccaagtaat	ctatcaagtc	ttataaaggg	19800
	cggggtgctt	tttgttctag	tcattttagt	ctcttagtac	ccaatatagt	gtttggcata	19860
45	tagaaaaatac	ccaacaaggc	cagtcgcagt	ggctcatacc	tgtaatccga	gcactttggg	19920
	aggctgaggt	gggaggatca	cttgaggtca	ggagtttgag	accagcctgg	ccaacatggg	19980
	gaaaccctgt	ctctactaaa	aatacaaaaa	ttagccaggc	gtgggtggcg	gtgcctgtag	20040
	tcccagctac	ttgggagggt	gaggcaggag	aatcacttga	actggggagg	tggaggttgc	20100
	agtgagctga	gatcactcca	ctgcactcca	gcctgggtga	cagagtgaga	ctccatctta	20160
50	aaaaaaaaaa	agactccatc	ttaaaaaaaa	aaaaaaagaa	aaaagaaaga	aaatacccaa	20220
	taagtagttc	ctgaatgaat	agatgagaat	aggttctatga	agggttcatga	attggaaacc	20280
	gtgattgcta	gggaggcttt	gagttgatgg	tattgtgttg	aaccatgtgt	taccagaggt	20340
	caatttagat	tttacaactt	gttttctctg	ttccttttta	tagtaatttt	ctgtatgtgg	20400
	tgttttcccc	ccatgagatt	gtataccatt	tctcagcgag	aactgtgtgt	aatgcttggg	20460
55	ggctccctca	tgggtccttg	catggaattg	gacttcgctt	cagtggatct	gatcccagtt	20520
	atgttaaatgc	tcgatggagc	taagtcttat	ctcgaagcag	tccatgtctt	catcagctgg	20580
	ccctgcctcc	atgccctgca	cagacctggc	cactctggag	aggtagtttc	cctgtggctt	20640
	attagcttta	tgttccagtg	tgttgcccaa	gtatgagaga	catcagtggt	atgagagagt	20700
	ctctctcatt	caaacttcgt	agggttttga	gctgggactg	accagtgtct	acaggaaata	20760
	gaggcatatta	ttaaaagcca	gagatttttc	aagttgcagg	aagcaaagct	cttgttagct	20820
60	atgattttgt	ggtgggtttg	gtagtccaat	ataaaaagtaa	aaactggatg	acaatgggag	20880
	gagcatgctt	gggtctccaa	agtttagatca	tttttccctaa	gtaatttctc	tttaaaacttt	20940
	tactgggtttg	gaatttctct	agattttgat	cttgcagaaa	agttttatag	aaaagttctg	21000
	agcagatgac	acttttgcgt	ctgaaaccac	atcattgttt	ttgtttttta	cttttttctt	21060
	aatatattat	ccttagttca	gccctgaaga	ttattctggt	atgttgggat	ctcaactttc	21120
65	cccccatctc	ctggatcttt	gtgaaatgaa	tggattaat	tgaatagaga	aggaagatat	21180

	aaacataaac	ttagtcaaaa	acttggttctt	gactaggcaa	gttgggcttt	atagctttga	21240
5	gctgatgaca	tgtctattct	tgtgaaaaag	ggattttttag	tgttgggtttg	gcttcttctgtt	21300
	atatttgatt	tattattatt	atcattatca	ttattttttga	gacagagtct	tgctctgtcg	21360
	cccaggctgg	agtcagtg	ctcaatctcg	gctcagtgca	acctccgcct	cccagggttca	21420
	agcgattctc	gtgcctcagc	ctctggagta	gctgggatta	caggcggttg	ccactacacc	21480
	tggttaatat	ttgtattttt	agtagagaca	ggtttcacca	tggtggctag	gctgggtcttg	21540
10	aactcctgac	ctcaggtgat	ccacctgcct	tggcctccca	aagtgcctgg	attacaggcc	21600
	ttagccactg	tgctggctg	atTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	tttaggtttg	ttttaactgg	21660
	aactttacgt	gaatgtaatt	gaatttagaa	taaaagcact	taatttcaca	gtgtgcagtg	21720
	aactttctgt	tacttatttt	aacagtaaaa	cccttgccag	taaatgactt	ggagcaaaga	21780
	ttgctttttt	aaaaaatggt	ttaatttggt	tttcttttct	tgagatggag	tcttgctctg	21840
15	tcaccaggct	ggagtatggt	ggcgcatct	tggctcactg	cagcctcccc	gcctcctagg	21900
	ttcaagcgaa	tctcctgcct	cagcctcctg	agtagctggg	actacaggca	catgccacca	21960
	tgccagctta	atTTTTgtat	tttttagtaga	gacaggggtt	caccatgttg	gtcaggatgg	22020
	tcttgatctc	ttgaccccg	gatccaccct	cctcgccctc	ccaaagtgct	gggattacaa	22080
	ctgctgggat	tacaagtgct	gggattacaa	gcgtgagcca	ccacgcctgg	ccaatttttt	22140
20	tttttttttt	cttttttgaga	cagagtttca	ctctgtcacc	caggctggag	tgcaagtgtca	22200
	cagtcataaac	tcactggcag	ccttaacctc	ctgggctcga	atgatactcc	tgccctcagcc	22260
	tcccaagtaa	ctgagactac	aggcatgtac	cactgtgccc	agctaattgt	ttttttat	22320
	tttatttttt	gtagggacag	ggtctcgcta	ttttgcccag	gctagtctac	aactcctggg	22380
	ctcaagcagt	cctcctgcct	tgacctccca	aaatggtggg	attacaggga	caagccactg	22440
25	cacctggcca	aggattgttt	tttaagtga	ctgagaccca	gccttattag	tggtcccaga	22500
	gcagacctgg	gacctgaagg	gaacctttt	cttctgggtc	agcgtctttc	ctctgatggg	22560
	ctactttcct	ggagcctttg	attgcctgtc	atcagagtaa	ctgagtttga	acagagtagg	22620
	tagttcctct	ccagaccacc	acactcacca	gctttcattc	tgcttctctc	gttttagactg	22680
	tggttctgaa	tcctcagttc	tatttactga	gtgtttttta	acataaaaa	gcctttta	22740
30	gagattgaag	gccagaggtg	ggacagttga	ggacaaaagta	gaaataaaac	cttcaaggcg	22800
	gggtgtgttg	tggtgagctt	ttttgttttg	ttgttttttt	gagactgagt	ctcgctctgt	22860
	caccaggct	ggagtgcagt	ggcacaatct	cagctcactg	caacctccgc	ctcccgagtt	22920
	caagctattc	tcctgcctca	gcctccttag	tagctgggat	ttcaggctcc	cgccaccatg	22980
	cccagctaat	ttttgtattt	ttggtagaaa	cgggggtttca	ccatgttggc	caggctggtc	23040
35	tcaaactcct	gacctcaggt	gatctgtctg	cctcagcctc	ccaaagtgct	gggattacag	23100
	gcgtgagcca	ctgtgcctgg	cagggagctc	tatagaagct	gtcgtggaca	atgtgggaag	23160
	tagtgagcct	ttgtattcca	gtatgctggg	ctccactgtg	cttgctctgg	cccccggtcg	23220
	ctctctgtgt	gttattgagt	ccccatccac	ggccatactc	ttcgtcctgc	ttctctcctt	23280
	accatcctct	ccccgctagt	ggtaccacgg	ctaccactag	caattactga	catgtgggat	23340
40	cttagggcta	cttccctata	aggctgcagg	gcattgtggtg	ttggctacgc	gcattggtaac	23400
	catggtagcc	ctgtggttct	ccacatgtgc	gccttgtgac	ctgggattgg	ctgcagacta	23460
	gtaataaaact	gcgtcttctg	gtatggaatc	tgtctgtagt	tgtactttct	acctctgtat	23520
	ttaaggggag	atctgtaacc	taccaatgcc	agttgaagag	gatggatgat	agagatgtta	23580
45	acaaacagct	gaaaaactaa	ctacaatggc	ctgcaaaaata	gaacagcagg	tttttgtggc	23640
	aaaactttgt	gtccatgagt	ttgtttttta	aatatcctca	tataatctgt	tttaaatcga	23700
	gaggcttttg	gtaaaagcca	tggtctagtct	tacatgtcat	ggagtaccta	ctttgtgagg	23760
	ttcacagttt	attatttaca	gagtggtccc	ttaaatcttc	tttgggtcgg	ttcagcgaat	23820
	gttgctcaga	tggaactttt	tggtgcacat	agagtcaaaa	tggtaatcaa	gcattgaaagt	23880
50	acagacagtc	cttaacgcac	aaatgtgtca	tgcttgaaaa	gttggaagt	tggttctctg	23940
	gagctctgat	tgtattgtcc	tgtagaatcc	gtgtgtgtgaa	tggtggttaa	atcccaaatg	24000
	agtcctgtaga	acctatataa	tctgcaatat	acctgcagta	ttccaattaa	tatgtaattc	24060
	ccccatagaa	ctatgttaatt	gatttgtatg	tatgggtattt	aatattatac	ataataatga	24120
	ttgtatgaat	aaaaaacatt	ctgggctcca	tgtggatgat	gggtgtgtgt	tgtgtgtctg	24180
55	tctatgtgtg	ggtgggtgtg	tgttcataga	tcccttttcc	tgcaatcctg	gcactggaat	24240
	tggtttttatc	atttccaat	aagtttctatt	cccatgaatt	ttggagtaca	gactgggtcc	24300
	aggtatgcag	ggcatagatt	agagccctga	gaaataggat	taggctggaa	ttgctgggtt	24360
	ggagatcagt	agcttcacag	aacacttttt	gggcctggct	gtcttcatta	tccccctttg	24420
	ttttctcctg	gggtctgcag	gtattgccct	gttttgttcc	tctaataatca	cttttttttt	24480
60	ttttctgctt	ttgaccaggg	tttttgccct	tgggtctacaa	ctgaatatcc	tatcagactc	24540
	tctgtatttt	gaaataaata	tatagttttt	ttgaggtgtt	ctagcgaatt	tctaaatcta	24600
	aatgttgttg	cagagttatt	acataactaat	tttgctatga	gaggttgtag	aatcccagat	24660
	gactaatctt	gtaaaaccata	cacgcatttc	catctaatcc	tccattgtat	atcatgttgc	24720
	agaaaaataac	agcctctaga	gtttacattg	cctcctttga	ctatatttct	tatttaagat	24780
65	tagttttcag	ataagacctt	ttcatggcag	tacataactg	tacagagggc	ttccaacttg	24840
	tcttgggagc	tctcatctct	gggagacatc	acattaccca	ctgccccctg	ccccccgccc	24900
	ccagcctgga	tgcaactcagc	ctgtacccca	tttctgtcct	cagccaaaca	ctgctgaaat	24960

5	gcaagagctt	tcaattgcta	gccagtgaag	atgcagacta	agggatttcc	atgtagaagc	25020
	ccgctctttt	cagctggctc	gtcagagagct	ggaggccccc	tgcttgttca	catgaggctt	25080
	tttgtccctg	acttggtggc	tgctgtttca	cttctcagca	gaaagggaca	cccttgcccc	25140
	ccccagaaa	ggaagatttg	atgtaccact	tccgaaaggt	tcagtcgggc	atcactgtaa	25200
	ccaagaagat	aggctcaggtg	aggctggagg	tggaacaggg	ctgctcgcta	gaactccaga	25260
	ttgttccaca	agtgccttct	ggcagagaat	gatggaagct	tccgtgattt	ttttttctcc	25320
10	ttaatagtta	tgagcacaga	agaggagcag	attgtctggc	tatagaagct	gtcttatttt	25380
	ttatttttgt	ttttgagatg	gagcttttct	ctcttgccca	ggctaaagtg	caatggcgcg	25440
	atctcggtc	actgcaacct	ccgcctcccg	agttcaagcg	attctcctgc	ctcagcctcc	25500
	tgagtagctg	ggaattacag	gcatgcgcca	ccatgccaga	ctgatttttg	tatttagagac	25560
	agggtttcac	catgttggtc	agtctggttt	cgaactcctg	acctcaagat	ctgcccacct	25620
15	cagcctccca	aagtgttggg	attacagggtg	ttagccactg	cacccggccg	aagctgtcat	25680
	attaaatagc	actttctgct	tttagcaaat	ttaatccaaa	tgagacttta	gattttcttg	25740
	ctctgactta	ccagcagttc	cttgaacac	atttaattat	ttttgccaga	aaatcactca	25800
	agcacttacg	ccattttttt	accgtgaaaa	tatgctgcat	tattttaaaa	tatattagaa	25860
	gtcagtaacc	ataagatttt	atatgttttc	taatgtattc	tgtaagcttt	ctgctgcttt	25920
20	tgtttggaag	gtgtattttg	taacgtagag	gactgcttta	tctgcttgta	agcttgattt	25980
	ttgtttttac	tgtaattttt	ttttcttttg	ctgtatttag	aaatacattg	agtaattata	26040
	aagtcagtgg	catgtttata	agttaatatt	tgtatctatt	ccttagttac	tctaactcaa	26100
	aacctaaagt	aatcttcaac	tctaatttac	tctgacatcc	agttgactgc	caagtcctcc	26160
	aacttaatcc	ttatcctttt	ttttttaaag	agatgcagtc	ttgctttgtc	acccaggctg	26220
	gagtgcagtg	gtgcaatcat	agcttactgt	aaactcaaat	tccctgggctc	aaatgatcct	26280
25	cccacgtcag	cctctggagt	agctggggct	acaggctcct	gctaccatgc	ccagctaaat	26340
	ttttattttt	attttttata	gagacagagt	ctcactgttg	ctcaggctgg	ccttgaactc	26400
	ctgccttcag	gcggaactcc	tgccctcagg	cggctcctcc	gcattggcct	cccaagtgcc	26460
	tggaattaca	ggcccaattt	tattcttggg	atgtatgtct	gaaactcttt	ccttcacttc	26520
	cttcccaagc	cttagttcag	gcccctctca	tctgtggtct	tcaaagtcgc	cttcagctgg	26580
	ttcaggtcct	tcccttctgc	tgtatctttc	atgggaggac	atgttatgta	tactgtcct	26640
30	acttgaaaac	ttccattccc	cattgatgag	ggtgttacct	ccagattcct	aacacaggtg	26700
	ctgaaggcat	gcctggataa	aggcactccc	ttgatctcct	ggccaggctc	ccgtacacct	26760
	gcagcgcag	ctccacattc	tgtctttact	gatgctgtgt	cttctgcctg	cggagccacc	26820
	caccattcta	ttcacagccc	ctgcctcagc	ggagcacgtg	cctccctctt	cctacactga	26880
	gctgtccttt	ctattgaatc	ccctcttttt	tgtagtatgg	gaaatatttt	attatgaata	26940
35	ctcttttctc	tggtgcctcc	gtgaccacgt	taactttgcc	ctaattcgcc	ttaggactcc	27000
	atctgcttag	gggaaaagta	ggatttggtt	acagaaagca	agctgctaga	aagaacagtg	27060
	tttagcttct	gacaggcaaa	ataggatttt	gcaacatgct	tttccttttt	aatgcttaga	27120
	cattttatat	gaattaatat	ttttatttgg	ttgcttatac	attactttct	tttttagctag	27180
	aatgtgaacc	ctataggaac	atggggattg	cctttcacat	ctttgtatcc	tcagtacctc	27240
40	atgttcagtc	accctgtggg	cttgtgtcgt	atatacattt	agccttcctt	aattaaccca	27300
	tatgtactgg	tccccgtccc	ccacccccaa	atagagagaa	agaaattcct	tgaatactac	27360
	attgccagta	tcaaaccaca	ccttgatata	ctctggggaa	agggaggtat	cagttgaaaa	27420
	gagaaaagag	gttaaaatct	aggcattaaa	atgtgtaagg	cttagatgct	ggcaatttaa	27480
	ggtatgtttt	cctgaggtta	attttgattg	tgtgcaaat	ttacctcata	tctaactgta	27540
45	ggatttagtc	accacataag	atgggatacc	tccataaatc	cttcagaaat	gtttgtgaaa	27600
	ttaaataaaag	ccttattgaa	gactcagctc	ttgagagtca	tctacctacc	taacagttat	27660
	tcttgaacag	aagagtotta	cttttcccta	taaggcagtg	tgatagccat	ctgtatattc	27720
	atataattta	tggttgcgct	tacttcattt	aaaaatgtat	tccgtgaatg	cagttgcccag	27780
	gcggtgtgct	gatcagaaac	gtgtaccaat	ggcctctttt	ataattataa	gagggaagacc	27840
	aaocctgaac	agtcacacaa	atgattaatt	ttaattgtgg	aggagtgtcg	ggaaagaaaa	27900
50	ataaaaagatg	caatgcaagt	gtttacaaaag	gagctttgag	cttggttgaa	gtggtccttg	27960
	ggcacttaag	caaggcttaa	agaatgatgt	gattagaagt	ggcttagcaa	ttctaaagaa	28020
	cacagggaag	gcgtgtggcc	agaacattgg	tccctagagc	acatcgccct	ctgacatacc	28080
	atttccttaa	gttaatgttt	taccactata	cataggccct	cccctttgtt	taccagatt	28140
	tttttaattt	taaggatgtt	tttaataact	tagaactcctg	taattttgtg	aacagtcctg	28200
55	tattcccttt	acttatatto	cttgagattt	tataaaatat	tttttacctg	tcccaagtct	28260
	tgattatata	tttttacctc	ttgttaagaa	atacttactt	ttctattttt	atgctatatt	28320
	tcatgtttac	tgtagaaaac	aaaaaaagta	aaatttttct	ttattcctat	cactgcagct	28380
	tataagcact	ctaaacattt	tgatctatata	tttgccaatc	atataatttt	gttaaaattg	28440
	ttgttgacat	aattgtagat	tccctgtcag	ttgaaagaaa	taatacagag	ctgagcgccg	28500
	tggctcacgc	ctgtaatccc	agcacttttg	gagggccgag	caggcagatc	atgaggtcag	28560
60	gagtttgaga	ccagactggc	caacatggcg	aaaccctgtc	tctactaaaa	atacaaaaat	28620
	tagctgggtg	tggtggcggg	cacctgtaat	cccagctagt	tgggaggctg	aggcaggaga	28680
	atcgtttgaa	ctccggaggc	agaggttgca	gtgagccgag	atggtaccat	tccactccag	28740

65

5	cctgggcaac	aagagcaaga	ctgcatactca	aaaataataa	taataataat	aaataaaactt	28800
	taaaaataaa	acagagagat	cccatgtgcg	ctttgcctag	ttcccccatc	cactgccccat	28860
	aacatttttgc	agaactgcag	tacagtatca	caaccacaat	actgacattg	atacagtcctg	28920
	ctcatctttat	tcatattttcc	ccagtgttac	tcgtatccac	gtgtgtatgc	attgtgtttt	28980
10	caatactctt	ttattataaa	gctgttttta	atgtgattca	attctaggtt	gttttgttct	29040
	gccctcaaaa	agcattccct	ctcctaataca	tatctccgtc	atacccttgt	atgttttctt	29100
	taaacctgtt	ttaagaaagc	agctacctgt	aagagaaatg	agattgaaaa	cagaattgcc	29160
	aatctgcttg	tactttataa	gcctgttgat	tgtttagata	cggttttagcc	agtttatagt	29220
	taccctgggt	gctgaaagg	atgctggatg	atacctaacc	aacagagAAC	cattgaatgc	29280
15	cgttcaaaat	ggactgaagc	atcagcaatg	tctgaaaaag	gcctgacagt	aatgtacatg	29340
	tcaaatggcc	cgtaatttta	gcagagtaga	gtaagtagaa	gaataaacat	ggggaaagtt	29400
	ccagcaacag	aggaggcttt	gagcttttgc	tcttcatctt	gagtggaatg	tggtctcagg	29460
	tggtaatagg	ccatcgagct	ttctccactg	gctgcctctc	tggggaacaa	ataaccgaaa	29520
	agatactcag	cacctgtgtt	ggtacatagg	tggtcagttg	atttataact	cctgggttttc	29580
20	agtgttgctt	gaattttcta	aatggaaaca	cagtaccttt	ataatcagaa	aacaatcccg	29640
	agttttgatt	tgagggtgtt	gtaaaaagtt	aaaaaaaaaa	aaacagaaat	gtgaaaagga	29700
	agttgtgtta	gagtatttgg	agttgagaaa	gcatgaaaag	gacagaagag	aagctgggtg	29760
	tcagggttgc	tggggtagct	acaagcacac	tgaccagaaa	gtcagctgga	aaaaaaatgt	29820
	agaaacagga	gataaaacgg	ccaaggggct	atacaagcaa	acagcaagga	cctgagaaga	29880
25	aaaactagtt	aggtgtgact	gtcagagtga	tggtacagt	gtgatccttt	ctgtgtaaaa	29940
	acaagcagta	agaattcgct	gtttacgttt	gcgtgtgttt	ggagaagagt	ggggaagagt	30000
	aggcactgcc	agactgtgaa	cactggttag	gttattgtta	tatctttgta	ttatatacac	30060
	tggacatggt	atttgtataa	tatgagaaga	aattttataa	atcattaaat	cttttggcat	30120
	ttaggaacat	ttgtgttttc	taatatgttg	ttctatacta	ttatctttat	tatatgccct	30180
	tcattctctc	agtgtttggc	tggtgtgttg	attccctttt	gtgagcagtg	ttgaagttag	30240
30	ctaactgtac	tttcttctcc	cttctttcac	cctcctccag	agtctgattt	gaagctattc	30300
	ttagtgctct	ctataaaagc	aataagcaag	attgttttac	ttttcacaaa	ctcgtcctgt	30360
	tctgtgcctc	tgctcggac	atagctgtag	tatagagtgt	tgtctccctt	acatccttct	30420
	atcttagacc	tactagtaaa	tattaatgct	cactctaagt	tcttctcaat	tctttttttt	30480
	tttttttttt	ttttttttga	gaaagagttt	cgctcttggt	gccagggctg	gagtgcaacg	30540
35	gcacgatttc	ggctcaccgc	aacctccacc	ttctgggttt	aagcgactct	cctgcctcag	30600
	cctcctgagt	agctgggatt	acagtcacgt	gccaccaccc	ctggcaaatt	ttgtattttt	30660
	agtagagaca	aggtttcttc	catgttgcc	aggctggtct	caaactccc	acctcaggtg	30720
	atccacctgc	ctcagccttc	caaagtgtct	ggattccagg	cgtgagccac	cgcgcccagc	30780
	ctcttctctc	aattcttctc	gaagctcttt	ctgcactaga	ttcctcagga	agggcttctg	30840
40	ggaacaatct	tctgtgaatc	aacagtacat	attcataata	gtttgtcagc	agcctattat	30900
	tttaaggcca	tttgggtctg	atataaaaa	gtttggatca	cattttcttt	ctttaaggta	30960
	aatatgttat	tctgttgtct	tctggtataa	agcattgctg	taaattgttg	acagtctaata	31020
	tatcttttgc	ttataagtga	cttaggggtt	tttgtctatg	tgcccaaagg	attttttccc	31080
	tctttctctc	tttttttttt	tttttttttt	tttttaaaaca	gacagatctc	cacctgtttg	31140
45	cccaggcttt	agtgcagtga	ggcagtcaga	gcttactgaa	gttttgaaact	cctgggcttg	31200
	aggaacaaag	gattttttta	accttttaat	tcaaagtctc	atcatttatg	caaccatgtc	31260
	ttgggtgttg	ctgttttggg	ttgttctccc	tcaaaaaatc	atgtgctctt	tcaatatgta	31320
	gttttaaatc	tttttttttt	aatttcagga	aaactctgaa	ttagagtttt	cogtttttctg	31380
	tctgggtacat	tgcttggggt	tccttcttca	ggaactcagc	ctgttatgtg	tatgtttgat	31440
50	cttctttgac	tgctgtctgt	ttcttttoact	ttctctcact	tttttaaaact	tcattttatta	31500
	aaaaaaaaatt	tttttttcga	gacagagtgt	cgctcttggt	gccagggctg	gagtgcaatg	31560
	gcgtgatctc	ggctcactgc	aacctccgcc	tcccagggtc	aagtgattct	cctgcctcag	31620
	tctcccaagt	agctgggatt	acaggcatgc	gccaccacgc	ccagctaatt	ttttgtattt	31680
	ttagtagaga	cagggtttct	ccatgttggt	caggctgggtc	ttgaactcct	gacctcgtga	31740
55	tctgcccgc	tcagcctccc	aaagtgtctg	gattacaggc	gtgagccact	gtgcccagcc	31800
	ttattaaaaa	ttttaaaaac	atacatttaa	acttaacaga	aaaattatga	gagagaagg	31860
	gggtggtgcca	ggctttttta	aacaaccagc	tcttacatga	actcatagag	tgataaactca	31920
	ttaccatgag	gacggcatca	agccgttcat	gaaggatctg	gccccgtgac	ccagacacct	31980
	cctactaggt	ccatttttta	cattggggat	cacatttcaa	cgtgagattt	ggagggggca	32040
60	aaactacaaa	ccatgtcact	cagggatttg	aggagcaagt	accacctata	ctttggactc	32100
	aggtagaaag	gcaaaaatat	caggaaataa	gctgctaccg	tccaggggtc	agcagaggtg	32160
	cccatacgcc	tgccaagtac	tcaagagtcc	agcctctagg	gagctaatac	taatgggtga	32220
	ctcttcgagg	ccaggggagc	tgggaaagaca	gtgcttgcca	cccctgcctg	aatagtggtt	32280
	gcacagagag	ttctgttgtg	tcttgattgg	gtcctcctgc	cactgggaat	gctgtggatt	32340
	atactaggtc	tctatctggc	ttgtttcagg	gctccatgtg	aaaaccttct	tgatatccta	32400
65	gccatccacc	tgctcagtc	ctagtttgca	aggaggtgtg	ggggagccta	gattctgtgt	32460
	cagatagaat	gtactacatt	ccgtctcagg	aatgtaccac	atcagaaaac	agtgcgacct	32520

ES 2 634 450 T3

	gcaggagaag	tagaggtgaa	gaggcacatt	cttccgagaa	atgtttctct	caacaccag	32580
	cattccctgg	atatcagcag	gaaattactc	actgctagaa	aatgccccat	gagcctctcg	32640
	ttaaggaggt	caagggagag	aacagagaaa	gttctcaaa	ttgacttggt	cactggtact	32700
5	ttcttatgcg	gttcttattt	tgtttgccat	cgtcatcatc	atgctatgct	tattttctca	32760
	atccaaatcc	actgctttca	ccttggttct	ttctgaccgg	tttggcacac	tcattcagta	32820
	aatccttatg	gagagcccaa	tgtctgcata	attgtgctgt	gctgatgacc	aagctagacc	32880
	tacgagtgtc	ggctcctttg	agatgtacgg	gacagctctt	ctgtcatctc	ttctgggaag	32940
	cctctccagg	cttggtgaac	agtggcaaga	tgtttaacag	ttgtacatgt	gtcccattgt	33000
10	cctttctaag	agcctgggca	aaccagaccc	ggtcgaggt	catcgtagta	tggcgtgagc	33060
	ttcctctctc	ctttctgacc	ttttgtgtga	tggcaagaac	ctgcagagtg	acacaagcag	33120
	caggcttctg	aggttgctct	agcctcagaa	tggccgtccc	ttctccaccc	tggccctcat	33180
	tgctgaggtt	tcctttgaag	caacagtgcc	ggaacagact	aggggaagca	gcttgacat	33240
	agctgtatga	tttattacca	cccattgagg	ccaaccaaag	tcggcaagga	gaggtagcag	33300
	gtcagtggtg	cctggaagct	tcctctttcc	tttgaccag	atgtgactgc	tctgcaatta	33360
15	ctcctaata	tgctactctc	gtttttacta	gccaaacctg	atgtttttcc	cttcttctcg	33420
	tagaatagac	ttccctctcg	atcagtactt	tctactcaac	actattttgtg	gccacagtgg	33480
	gaactcattg	aggacaggga	ccatgacatt	actacctgac	ccatcaacac	ttggcataaac	33540
	ttgaaatgca	aggacaaaaa	ttggctgcaa	gtacaatgtg	gtcttcactc	tgaaggtgat	33600
	ccttaaaact	tgcttttggc	atcataattg	cttaatatata	ctaggggatt	gggtaaaaac	33660
20	agttacttta	aaagagtttt	acaattctgg	ccttctagct	atcttgtctt	cttaaacaa	33720
	agcacaaagt	gaatgtatct	tagtgaaatt	ttatatgggt	tgctttgagt	aatcttgcca	33780
	agattgattt	ttagcacagt	aggaaagaca	cattctaata	gtgatttttt	tcctccaggt	33840
	tatgtactgc	tggtgcatga	aaatctgact	agatttaatt	ttcctaaggt	tcctttgttca	33900
	tcctgatttt	tgcaagtcct	agggaaagct	ttgttttcc	cttaacctaa	cttagatgtt	33960
	gtcatttcat	gagcttttga	ggaagagtgt	atagccaatt	gtgtaatgtc	tttaaaaggt	34020
25	attatctctg	caatagttgt	ttataaggcc	taagtatttc	atgtaataat	agtggccccc	34080
	gatctgtttc	tagcaatagg	tatatggatt	ttggttccta	tatagttgta	gttggtggct	34140
	tgagatattg	agcaagccct	tttaagaaag	gatttggcat	ccctcagcct	tcaaaagctt	34200
	ctcaaaaact	atcatatggt	attagcaaa	gtttactgcc	tgcttccatt	gtatagacaa	34260
	tttatttttt	atgtattccg	ttctaagaag	gcagatgacc	aaaagatctt	gcatctgttg	34320
30	cccaaggctt	gtgactagag	aggaaagaga	taagaatact	tttttaaaat	cccattttac	34380
	taaatatggt	gaggaagtgg	taagatatat	taatttgttg	agatttttct	gttatgccta	34440
	ttatatgaaa	taggtactct	gaacatggct	tcttaattaa	atatatttga	taaaatacaa	34500
	ccttgcttcc	ctggagttta	gaagtcagat	aactgccatg	gagagctatg	ctttctttgt	34560
	tttaaaagatc	tgcttatgaa	catgataaac	aggaacaatt	taatgttttc	aatattttct	34620
35	tgtattttac	tgcaagttta	tacacaacat	aaatatgggg	gaagggggaa	atgtttatag	34680
	cagagccatc	ctgcccattc	tttccttaca	gaaggacaaa	ggagcagtat	ttattttaac	34740
	tacaaaaata	ctattgtagg	ttttaaaaat	tccgtatatt	ttgatattct	gtgttcctct	34800
	tgacctttta	tttgctaaat	aggtgcgaa	aatgaaggta	acctgcatca	tcttcttaaa	34860
	aaccaactct	atctaattat	aatagtttgt	ctatctctga	aaaatagtga	tgtgttcatt	34920
	ctgaaatcag	aactaccgga	tgagctgca	ttttgttact	atgtgaattt	cgggagaggg	34980
40	aggaggatgc	agcctttcga	gctgctgaaa	tacacaaaca	caaagaagac	accaagcata	35040
	gtagaactgt	gttaagctga	ccaagccaga	agaagcacct	attctcagca	tagtatgaga	35100
	cgtaaaaggca	atataatggg	catagttgaa	gatggtagaa	ggaaaataga	ctctgatggg	35160
	ttaatgttaa	atgctttttt	taaaaaagtg	gtattccaat	atcgaagaag	aagactttct	35220
	acttttagaa	gcaataaagg	aaattgcaga	ggaaaagggtc	aatagggttg	aatacataaa	35280
45	aattaaaaac	ttttaaactt	tttttttttg	agacagagtc	tcactctgtc	accaggtctg	35340
	gagtgcattg	gtgcaatctc	ggctcgctac	aacctccgct	tcctgagttc	aagcaattct	35400
	cctgcctcag	cctcccaggt	agctgggatt	acaggcatgg	gccaccactc	ctgctaata	35460
	tttgtatttt	tagtagagac	agggtttcac	catgttgtcc	aggctgatct	caaactcctg	35520
	acctcgtgat	ccgcctgcct	cggcctccca	aagtgtctgg	attacaggca	tgagccaccg	35580
	cgcctggact	aaattgtttc	agtattaatt	ttttttaaaa	caagatctta	ctgttgccca	35640
50	ggctgaagta	cagtggccca	atcatggcta	actgcagcct	tgacttcttg	gcctcaaggg	35700
	atcctccac	ctcagcgtcc	cgagtgcgtg	ggaccacaga	catgtaccac	cacaccagc	35760
	tacttgtttt	atttttattt	ttgtagagat	gaggtttcac	catgttgccc	aggctggtct	35820
	cgaactcctg	ggcccaagca	atcctcctcc	cctggcctcc	caaagtgtctg	gtattacagg	35880
	tgtaagccat	tgccgcctgc	ctgatttttt	aaatgtgcaa	acagataagt	tggaaaagtg	35940
55	attttccaata	aagataaagg	gttgatgggt	ttaaaatacg	taaagagctt	tatgaatga	36000
	gaaaaaacact	aacattccaa	aagattagaa	ggcaaggac	agaaagaaac	aatcactat	36060
	gtctgggaag	ggacatgaag	gagcaggttc	ccactgggctc	agcggggctc	aaaccactg	36120
	gggacgtccg	agagactgca	agggccatgc	cttcacattg	ccgtacctga	gaagcaagga	36180
	gctgggggat	ttatctcttt	cacactttgg	gaggctgagg	tgggaggatc	acctgaggtc	36240
60	aggagtccga	gactagcctg	gccaacacag	tgaacccccg	tctctactaa	aactagaat	36300

5	aattagctgg	gtgtggtggc	acacacctgt	aatcccagct	acttgggaag	ctgaggcatg	36360
	agaattgctt	gagcccagga	ggtagaggct	gcagtggagc	taaattgcac	caactgcactc	36420
	cagcctgggt	gaaactctgt	ctcaaaaagt	aataataatc	atgataaata	aaataacatt	36480
	agattgttag	cagaagtagc	cacaggtttc	tcccacctct	ctgcaagttg	ctgagtgtga	36540
	ttcccatcaa	gaggtacaat	gtctttttat	ttttatttta	tttattttat	ttatattgcc	36600
	tatgttgtct	aggctggttc	caaactcctg	agctcaagtg	atccttctac	gtcagccccc	36660
10	caaagtgttg	ggattacagg	catcagccac	tgcacctggc	ccagataactt	tttcttgagt	36720
	aggaatttcg	agtcaccctg	aacattgcat	gccttcgtag	tggggaagac	aataggaaac	36780
	cacaggctgt	aggctaaaa	gggttgtgtt	tcttgtaacg	tcattgacaag	gcataaccac	36840
	tcttggcata	gtaaatagta	agcactcact	gaactgatga	ttttaaatct	ttgtgtttta	36900
	ttcagcaata	tcctaaatta	gcgctatgtt	agtggagttg	catctccctc	atggattagt	36960
15	ctgaaaaaga	tgagaaatct	gtatgtagac	caagttatcc	ttaaactgct	cataatgtat	37020
	gatgcacgtg	gttttacgtg	tacagcctgg	taccattgtt	cttaggcaca	tttcagtgcc	37080
	agaactctta	ataccagga	agaagcaaaa	agaaagatgg	aggtgcagct	agaggttgtg	37140
	gcctttgaac	gattcattct	gccttaataa	gagtggtctg	gctgagctcg	gtggctcaca	37200
	cctgtaatcc	cagcactttg	ggaggccaag	gcaggcagat	cgcttgagcc	caggagttca	37260
20	agaccagccc	aggcagcata	gcgagacccc	ccctccccc	gtctctacaa	aaaaatagaa	37320
	acaatgagcc	aggcatggtg	gaacgtagtg	cgtgggtgct	gtagtctcag	ctaccagttt	37380
	ggctgaggtg	ggaggatcac	ctgagcccta	gaagtcgagg	cttcagttag	cccttattgt	37440
	gccactgcac	tccactctag	gtgacagagc	gagacaggtc	ctgtctcgaa	aagaaagaag	37500
	aagaattaaa	aaaagtgatt	agatcccttg	tgtttgggac	acttggtggc	agcagggatg	37560
	gtagcgttta	tgagggttgc	atgtaacatc	gcctagctca	gacatctgtt	tgactgtctt	37620
25	ccccctgaa	gcgcaggctc	tgtgagggca	ggtcttttgt	ctttcttgtt	aatcttcata	37680
	tgcttagtgc	ttgccacata	gttgatgctc	agtcgatatt	tggatgaatt	gaagggatta	37740
	atgcattgaa	tctgaacctt	gctttcttaa	tgcatatggg	gagttctttg	gaaagccaca	37800
	cagaggagct	tggttgccctg	cttccctctc	tccccagatt	gtctttttat	tgttgtggct	37860
	tcactgaagc	actctcactt	caaataatth	tgggcattgg	tcgtatttta	ttctttgttc	37920
30	cttcttcac	cttacccttc	agatggtagt	tagaaaagta	cactacatct	agaaagtact	37980
	ttataaactc	atthgttga	taataataca	tatgcctttt	ccttggtcct	ggtagcagaa	38040
	tcttgtgcca	ctcttgggat	acaaacgaaa	ttcttaacca	aagccagttt	cattttgatg	38100
	ttctattttc	ctccatttca	cactccaaat	tgtgcaccaa	agtatcatcc	tagttttgtg	38160
	aggatggttc	tccataacttc	agggtaggag	tatcatgtgg	attcctatga	tacctttctc	38220
35	cctgggacca	tggagggcag	cagctggtga	ttgatagtct	gattcccggg	gaggaaagct	38280
	gtgagccttc	cacttgccaga	tgtctgccaa	ctacatgtgt	ccttagtcaa	ctgtaccact	38340
	gtcctccggc	aaacagcaga	agcccagggc	ctgaagttct	taagctgtca	ttatggaaaag	38400
	cagaaggtaa	acaaaacaga	agtgaagta	gattttaattt	tttagactgt	tctcttacag	38460
	gaattgtttt	gtggttctca	gcatttttaa	aaaaatagt	gttccaatat	gttttattga	38520
	catcaattac	tgtaagtctg	attcattttc	tgctatttga	tttctaccca	agggtgaaatt	38580
40	catgacattt	aacagaaagc	ataagtgtat	ttttaaaagc	agacactatt	agggacggtg	38640
	aaaataagat	ttaaagtogg	gacacttgaa	aaagcaattt	ttataccttt	ggtaacgatt	38700
	ctattctgat	tctttgtata	aataatataa	acaaaggctc	tagaagctta	ctaatatgaa	38760
	gtttgtgtgc	tgtttctaaa	ttctggttta	agggccaaat	tcattttatc	tgcaattact	38820
	tttttttttt	tgagagtctc	gctctgtcac	ccaggctaga	gtgcaatggg	atgatctcgg	38880
45	ctcactgcaa	cctctgcctc	ccgggttcaa	gcgattctcc	tgccctcagc	tcccagtagt	38940
	ctgggattat	agggtgtgcg	caccacgccc	ggctaatttt	tgtattttta	gtagagacgg	39000
	ggtttcaact	tgctggtcag	gctggtctca	aactcctgac	cttgtgatcc	gcctgcctcg	39060
	gcctcccaaa	gtgctgggat	tacaggcggt	agccactgca	cccggccgtg	ttaaaatttt	39120
	tcagtggtag	accactatgt	caatatgttg	ctttcactga	caacagtatt	ttcttaaga	39180
50	taggataccc	catttctaga	tgaatctcat	tctagctgga	aaataatttt	tcagttctga	39240
	aactacatca	ggcctcaggg	aatcaaaact	agctatttag	cacacacata	taaagtggct	39300
	ttgctttata	aacgatttag	ggtcaccatc	aatgacaatg	gtcccttttt	attgtatttt	39360
	taagagtttc	ttatcttaaa	tggctgcata	actgtagagt	tttaaaaaaa	ttaagtaaat	39420
	gaccatgtta	atgctctatt	aagcttccaa	acaatattgt	aatttacttt	gaagattttt	39480
55	ttttattctc	aacatcctgc	agcttgaccg	tttgccctcg	tgtctcagtg	ctgcttattt	39540
	tgaggtgtgg	actggagtcc	atctgtcccc	cttgccctcg	aactgctccg	ttttgtgttt	39600
	cgtaattctt	catgctgcat	cctgggcgca	tttctctgta	gtagctttca	atttgctcat	39660
	gctttgactg	ggcttagtct	agcgtttatc	ctatctctta	agggttttta	aaaaattttc	39720
	atgattattc	atthatttcc	aggattttct	atttcttcag	tcacatctcc	ttgtctgtgt	39780
	tttacttctt	cctgttttta	ttcataacat	cttttttata	cacgattcct	tcattgtattt	39840
60	ctaactctaa	gtatatttaa	ttgcttattt	gattcttttt	tttttttatt	gagacagggt	39900
	cttactctgc	caccaggccg	gagtgcagtg	acatagtcac	agctcactgc	agcctcaact	39960
	acttggactc	aagcgacctt	cccacctcag	cctcccaggt	agctaggaat	acagggtgtga	40020
	gagccgccac	accagctga	tttgtcttac	tatgttgccc	aggctggtct	tgaattcctg	40080

ES 2 634 450 T3

5	ggctcatgtg	atctgccctt	cttgccctcc	tgaagtgtctg	agattatagg	tgtgaaccac	40140
	tgcacctggc	caagtatgtt	tatttattta	ttctaatttg	agagggagtc	tcgctctgtc	40200
	gtgccagggc	tgtagtgcag	tggcacaaac	ccagctcact	gcaacctctg	cctcctgggt	40260
	tcattgcgatt	ctcttgccctc	agcctcctga	gtacctgggg	ttacagttgc	gtgccaccac	40320
	acctagctaa	tttttgtgtt	tttagtacag	gcgggggtttt	accctgttgg	ccaggctggg	40380
	cttgaaacttg	tgacctgaag	tgatccgccc	gccttggcct	cccaaagtgc	tgggattaca	40440
10	ggcatgagcc	accacgcttg	gcccaggtat	gtttattttt	aaagtcccca	acaagctata	40500
	caataaattg	catatggaat	ggatttttgt	tctagttgat	ttgttggtta	tcattttag	40560
	aactaactag	ttgtcttctg	tgtttgatac	cttgcttcta	ggtcattttg	agttgggagc	40620
	cttttgtttt	gtttttattc	tcattgctgtt	tttgagccta	gctgtgcctt	tatggttttc	40680
	tctaaattta	attgaccatt	gttttatatt	tggagcagtg	ggtgtacatc	agagtgtgaa	40740
15	agcagcccca	ccctctccac	cagaaggtct	ccatgccagt	ttcacgaagc	atttttcatg	40800
	ccctcattcc	tgcccttata	ccttgatttg	tggggagttt	gtaaagcagt	tgattgtttt	40860
	ttttccacgt	agttttccaa	gtgcacataa	gtgttctgtt	agtgacttgt	agctccatta	40920
	tctattaacc	ttgcccaga	ccactgtaca	agcggacca	acgcttcctc	cagctgtggc	40980
	agggacagtt	acttggtatc	ctgctgcctt	ttcaatgctg	accagttttg	cccttcctc	41040
	ccctcaacc	ctgtctttca	ttcaactatc	accaaaccac	aagattctgg	ttgtcttttt	41100
20	agtatgtgtt	cttattcagt	acatagtcat	tttaaaattt	aaaccaaacc	agacttggtt	41160
	ctgattagct	taattttaag	ctttttcttt	attattaaac	agtgtagttt	atcttagcat	41220
	ttcatattaa	gtatatgatt	tatttcatat	tgcttatatg	aatgtacaca	taaatataat	41280
	aaaaatattt	tcctaaggtt	ttttagtaga	atttatatct	ttcattaact	ttcatatata	41340
	gcattgtttt	tgacctgaa	gacattgaac	ctctgatgat	ttgtatattc	ctcggagtat	41400
25	actttgtttac	atagaaattt	tctcatttat	aatgagattt	gtgattaaca	aaatttggtc	41460
	aacatgcatt	actttgaaga	tctggtttct	aaaattttat	gctagttaac	ccaccccccc	41520
	ttctatatat	atctccctat	tcagcgacta	ctgcaagagt	tccaggaaat	gtacactgtg	41580
	tgttcactta	ctgcatttta	aatcattgcc	ttactatata	ttctgcattt	cccttcaatc	41640
	tagctctgtc	tgtacatttc	tgaaagccag	tagcttccct	gaagaaccag	gtaacaacct	41700
	gaacaaatca	attagataac	catttttaga	atggagggtc	cgggagatct	tagaagatgt	41760
30	gatgggtgct	aagggaacttt	gtagttccct	gaagttccag	tgagtaaaag	gtacccttgg	41820
	aattttttat	tccttcagac	ttttaaaaca	gagatcactt	tcaaaaatta	ctctttctgc	41880
	tttgaatcca	tgtttttagta	actattttga	cactgttttg	tcagaaggtt	gtgtgggtca	41940
	actgcaaaata	aataaaataa	atgtgatttc	agtaatttcc	attttgtaac	aagtaattga	42000
	gaaaatagga	ttggatcaga	tattttgctta	tacacattcc	ctttcaggag	cacttctgtt	42060
35	ctataaagaa	tgtttggtata	ttgttaagga	cacttcaagc	tttgggaacc	tttgaagtat	42120
	ccattgatcc	agttaacaaa	attatgttga	gtgcctaccc	tgggcctggg	cctgtgttag	42180
	gaggggacac	taagatgaga	gtccaaagca	cttcttctca	gactcctggc	tgctaattgg	42240
	ttgctgcctc	tacttcttca	cttagcagat	agcttttaaa	tgagtaatgc	attttaccat	42300
	ggagcccgta	agagacattc	acccagttgt	ggaccgagga	gaagggtgtt	aaaccagat	42360
	tgtgatgttt	cacttgatga	agtgcttaat	ataaacatgg	aaatatttcc	gcaaggataa	42420
40	actggtcttt	atgcctgtgt	gttttcagga	gaaatagaaa	tctctaatac	aatattgcca	42480
	gcttttcacc	caagtttgac	tttttgccca	attgagtttg	ggaggtgtct	gaataatgga	42540
	tacttgactc	tactgaataa	atataaaaat	taattaactc	caggctctaa	ttcattctgt	42600
	taccagagtt	ttgtaagcat	gttaccctct	tgtgttcatt	gggagatcat	ctgttacctt	42660
	cttaaatgag	tggggaagga	tgggaaatga	ggaagagcta	taaaaactat	tcagggtgaag	42720
45	aaggtttctg	cccctccttg	ccccttttaa	aatctccagc	tcagcagatg	ctttgtttta	42780
	acttgatcaa	gtgcttgtga	atcttcctag	cctagctaaa	tcataacttt	ggaaggactt	42840
	gcttttttct	ctcatgacaa	tggtttacc	cagaaatgat	tcagatcact	ttgtgtgcct	42900
	gatgcctatg	taaaatgata	cagtgaatg	gaaaccattt	acctgtaagc	tttgggcaca	42960
	cccaagcctg	cttcaggagc	acatgatcag	gcgtgcactc	tgggagagcc	gtacacattt	43020
	gacatctatg	atgtgtggcg	ttttattcta	tcacatttct	gaaatctaca	ctaagagaaa	43080
50	ggaggctctt	aaaaaaccac	tgaggtgtgg	actgggggaa	ggagagatcc	gtaaagaacc	43140
	tgtttgttac	ctggtgatac	tatttcccat	tggtaaaatt	tctaatttag	tgtgatccag	43200
	ccctgaaatg	ctgaggcaca	cactgaatga	ctcctgacat	ctttagtgtt	tttgttcagg	43260
	ggactcttct	gggaatctgt	ttcatggcaa	gtttattatt	cccttttggg	ttggctcatc	43320
	agtttaccca	gcagtcactc	taatcggttt	taaaggcttt	tattttattt	tgttttctct	43380
55	gtggaatttt	tacacattca	gtagattaga	agtagttatt	taatctttgg	ttagcataat	43440
	aaaagatctt	ctagggacat	tttttgcttg	cagtgggaag	ctagttaaat	gtgttcatta	43500
	gtcatgaatc	tgctttttct	atagctgttg	gaaacgtagc	tcccctgtga	tacagttgta	43560
	gaatacagaa	atctcgtttt	gctgttacgg	tacggtagtc	tacttacttt	cttccaaacc	43620
	attaatgtta	tagttacctt	taattgcgta	ggctcctatc	ccctcaattt	ttaagactct	43680
	aagcctggca	ttttatctta	caaaatgaaa	tataaagact	tgtactcaga	gtatgtgtgt	43740
60	gttttccata	taccattcta	aagtagagaa	agatgaggga	ttgccagaa	actgatttct	43800
	aataaaattat	ccagaaaactg	accccttctc	acctcttctg	ttactgtcac	tgtggtttca	43860

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

gccacagcat cctttgctgc attgttacct tagtttctctg actgtatcct tccctacacc 43920
attgatccct gcaatcccat ctgctgctag cagccagaag ggatccactt actgctgtga 43980
tcagaaatcc tcagccaggt gcagtggctc atgctgttaa tctcagcact atgggaggct 44040
gagactggag aattatttga gccaggagt ttgagaccag cctcaaaactg ggtaatatata 44100
tgagacctca tctctacaaa caggaaaaaa aaaatttttt tttttttttt aactagccag 44160
gtatagtgtt aatataacct ttctggggtc cagcatgtct tccctgacct gcagcttcac 44220
ctccaccact ttgcccctca ctcccaccac aatggctttc ttctcttctt cagacatgcc 44280
gtgcgtctct ctacctggaa tattccctct caaacattcc catggctcac tccctcacct 44340
tcatcagatc tctgttccag tgtaactttt actggaaggt cttttgtgac catcctactt 44400
attataaaaa aataatctgc ccaaccttct ccttttattt cctctacttg atttttcaat 44460
ttagtactta tcagctgaca tatattttgt ctctctgtct ctctctgtct ctcatagaag 44520
gtaaattcta taaaggagg aatttttatg ttgtgttctt tgctgtagct ccaatattca 44580
aaacagtgcc tgacacacag tagggccttt atatttgttg aataaatgtt gacactctga 44640
tatctaattt ttgtctgttg actaatacga aaactataga gtgataataa aagcattacc 44700
ttagtagact ggaaagggat gagcgctagg atgaactttc tgctggcgga tcttgctgaa 44760
tttagggagg agattggggt tcaaaggagg ctgaaatggc taggatttgc agagcagggt 44820
actaaggatg agcaggctat gacagaaaag actccagaaa tctgcaaagg gatcaccttg 44880
agtctggctg gatacagtgt acacttttga ggggtgtctt tcatgagctt ggataaagaa 44940
caactgttgg ggagtggata attcccagca ctattcaag cttgcatcgg ccagaacgga 45000
gagagacaga cctctgtaat acgtaggata tttggtagaa acattcaacc gaaaaccatc 45060
agatatgcaa aaagtaataa taataagtaa acaatgtgat gcatagctag aagaaaaatc 45120
agacattaga agcaagccca gaaatgacag atgataaatt agcagataag gacattaaaa 45180
cagctattat aaataactta gcagatttaa agaaaaacaa cataatgagg ataatggaag 45240
aaaaacaacc gaataccatt tctaaagaag aaaaatacaa tatctgaaat gagaatttag 45300
ctggatagga ttaatagttt aggcactgca gaagaaaaaa acagcatcta tatgagaata 45360
tacccaaggg aagtacagag aggaaaaaaa tgtggattgg ggggtgcctc agtgacatat 45420
ggaacaatat taaacaagtc tgcccccaaa atacttgaag gaataagggt caagtttttt 45480
ccagggtttta tgaaaactat aagcctacag attcaagcat ttcaacaaac cttcagcaaa 45540
ataaacaaaa ccacagtagg cctggcacac tgtctcatgc ctgcaatccc agcacttttg 45600
gagcctgagt caggaggatt gcttgagatc tgcttgggca acatagccag accctgtctc 45660
tacaacaaat aaaatgaaat aaattagctg gatgtggagg tccacacctg taactctagc 45720
tagcctggag gctaagaagg gaggttgcct tagcoccagt agttcaaggc tggagtggagc 45780
taggactgca tctactgact ccagcctagg caacagcaag accacatctc tctctctctc 45840
tctctctctc tctcaaaagg cagtgaataa acgacttatt tggggaaaaa ataaaggcag 45900
agaatttggt gccagcagac tagcataaaa aaaaaggagt ccttgaaaac gaagagaaat 45960
gataaaagat ggaaatttgg atatatacta aagaatgagg attgctaaaa gtgacataca 46020
tagataaata tgaatatata ttttatttta aaagcaaaaa taaaataaca 46080
tcatatttat aacatagaaa taaaaaatgt atgataatag cataaaggat aagtggacaa 46140
atgctgttgt cgtatttttg gtaaaatgca ctattatttg aaagtagacc atcgtgaatt 46200
cgatgcatat tgtaaaccaa atagaacact aaaaaatgaa aataaagaga tatggctaatt 46260
gtgccaatgg tggagataag atagatgcaa aaaaagaaaa acattcaaaa gaaggcagag 46320
acagaggaaa aaaggaccaa agatcaaata agtcaaatag aaagcagcta aactagcaat 46380
atggcagatt taaatctagc catgtcaata gtatatata atgtaaatgt tctaaatacc 46440
tgaattaaag gatgaagatt gtcagattag attgaaaaag catgacccaa ctacatgctg 46500
tctgtaagaa attagaaaaa gaacaaatta aatccaaagt aagaagaaag gaaatagagt 46560
agaagttagt gaagtataaa acaaagagca aagaaaatca attaaatgaa aagctggttc 46620
tttgtaaaaga tcagtaaaat tgataaaatt ctagctaaac tggccaagaa aaaagaaaaa 46680
acatacaaat taacagtatc aggaagaaaa acagagaatt caaaggagtg taatgcaaac 46740
tttatgctag taaatgcaat aagttagatg gtatggaaaa aaatgtgaac aatacaaaagc 46800
agactgttgt tgccttttgt ggcagttagc ggggtggagt ggaaggttga attgactgga 46860
accagaagca caagtgaact ttttggggtg atggaaatgt tttgtatctt ggttgcatgt 46920
atagttaaat ggttgtagac attgcttaaa actcactgaa cacttaagtg ggtatgtttt 46980
attatttcta aaatatacct caaaagcagt tttaaaaatg tattcaagta cctactttaag 47040
atctttgcat tttactctga gtatacctta attttaaaaa ctgtttttta aaaagtatta 47100
tgtagatacc ttttattttt ccaatgtctt tattaaatga catctccacg ttttgcttct 47160
tacctctatt tttttttttt tatttctctg tctctcaggc atgcacacac acacacccaa 47220
aaaagtaaat atgcataatc cttttggctg aataaaatca gttgcaactg ttatttcggc 47280
ccttatttgc tccgggtaaa tattcggttag ctgagtgggt tatctgtatc agatatttct 47340
tacatcttca tccagtcca ccagctggac tgaccagatt gtttttctact tcaagggcag 47400
aatttgtact cactgctgaa tgcttccaaa tgatacgtag aataacaaat ttaagactta 47460
gatttttact ttttcaggtc tttttttttt tttctgtgct gtatagcatt tccctgaaag 47520
cttaatatca tctgtaagtg atgcagtgga tgtgttacta ttgattaat ttatttactc 47580
ttaggttagt ttgtaatctg tcatcatgct gttgtttttt tgtgtgggtt tgttttttgt 47640

```

	tttgagacag	ggtctcactc	tgotgcccag	gctggagagg	ctagagtgca	gtgatgtgtt	47700
	tatgggtcac	tgcagattca	atctcctggg	ctcaagtgat	cttcctgcct	caacccttg	47760
5	tgtagatgga	agcacaggtg	caogccacca	cacccggcta	ttttttttaa	tgtattgtag	47820
	agacgaggca	tcattttttt	gcccagggtc	gatcttgaac	tcctgggctc	aaacaatcct	47880
	cccacctcgg	ctcccaaagt	gctgggatta	cagatgtgaa	ccaccactcg	agctccatca	47940
	ttctgttatt	agttgttctc	tagtatgagt	caaaaactct	tacctgcctt	tttacagttt	48000
	tataaataag	taagcagaat	agcagaatgt	ggacattttt	taaatccaaa	ttgaatatgc	48060
10	acatgactca	aggagtcaaa	tagtaccgta	atcggtttat	gataaaatcc	agtgggtttg	48120
	ctgggtgtog	tggctcacac	ttgtaatccc	agcaccttgg	gaggctgagg	caagtgatc	48180
	acctgaagtc	aggagtttga	gaccagtctg	acctacatgg	tgaaactact	aaaatacaaa	48240
	attagctggg	catggtggtg	catgcctgta	atcccagcta	cttgggaggc	tgaggcagga	48300
	gaattgcttc	aacccgggag	gcagaggttg	tggtgagccg	atatcgcat	atttcagaac	48360
15	aattttccac	aagatcagtg	agtgtgttcc	aatagacata	taatacaacc	cacatacatg	48420
	actttacatt	ttctttagtc	catagtagaa	aaggtcaaaa	gaagcagatg	aaattaatag	48480
	cctgggcaac	aagagcaaaa	ccccatcttt	taaaaaataa	aataaaatat	ggtgggtttg	48540
	tgtccccacc	tcagaccatt	tctctggtct	ttctcattga	ccaccactcc	caatctttgt	48600
	tctgtgtatt	gattacagct	tgtatatatc	ttcatatttc	taagcaaaat	gtttatcttt	48660
20	tttaaattta	taaattcttt	ttattatttt	tcagagacag	ggtcttaact	ctgtcgccca	48720
	ggctggagta	cagtggcacc	atcgtagctc	actgtagcct	cgaactcctg	ggctcaagca	48780
	gtcttcctgc	ctccgcctct	caggtagctg	agactacgct	acaggcacat	accaccatgc	48840
	ccagctcaaa	atgtttatct	tttgatacat	tattcgagac	cattattaag	gtggatgatt	48900
	tagttttctt	aaacagccat	ccccctctt	ttctccctct	ctgcttcacc	gccccattt	48960
25	tcccaatggt	ttaccttttg	gttaaatcag	tactcattgt	ttacattatt	tgccctctga	49020
	catagtcaca	gatagtattg	tactgtactg	tactgtgttt	ctttttttaa	cattatttct	49080
	gttgtaata	attgactttt	taattttttt	cctattttgt	tttttaaga	gatggggtct	49140
	tactatattg	cccaggctag	agttcagtg	ctcttcgggg	gcatgatccc	actgctgatc	49200
	agtacaggaa	tttccacctg	ctccatttcc	aacctggacc	agttcacccc	ttcttaggca	49260
30	acctgggtgt	ccccatttcc	cgggaggtca	gcatattgat	gccaaactta	gtgcccagac	49320
	ccgatcggca	taacgcgatg	agcccaggac	tcttgggctc	aagcagtcct	cccggtctca	49380
	agcagtcctc	ccacctaagc	ctccgcgcta	ctgtgagacta	cagacacttg	ccaccacacc	49440
	aggttaattt	ttgtgttttt	tgtagaggtg	gggttttgcc	atgttgtcca	gactcatctc	49500
	aaacttctca	gctcaagtga	gcctcctgcc	tcagcttccc	aagtagctgg	gattatagac	49560
35	gcatgccacc	acaccccatg	ataattgcct	ttttttttaa	tttgcataat	tttctttgta	49620
	gcttttgcta	atgttcccat	atcttcttat	agccttacag	aatgattttc	cacaagatca	49680
	gtgagtgtgt	tccagtagac	atataatata	accacataac	atgattttac	ctttttttgt	49740
	agccatagta	aaaaaggtca	aaagaagcag	atgaaattaa	tagtatcttt	tacttaacct	49800
	agttcattca	aaatgttatt	tcaataaatg	gtcaatattt	aaaatacttg	agatattttg	49860
40	cttttatatta	tttcttttgt	tactaagtct	tcaaaatoca	atgtgtattt	tacacttaca	49920
	gaacatctct	ttttagactg	gccacatgta	gctcaggggt	actgtattgg	acagagtggg	49980
	ttcagtttca	agtttttctt	tggagacatc	ctacttgaaa	tttccattct	ccatgtatct	50040
	gggtgggttg	tctatagact	tgccactcac	agctgtcatc	ttgagacttt	ctttgctttt	50100
	cttctctatt	ggatattcag	tttctctggt	ttcaggtctt	ctcattttcc	tctagttagt	50160
45	ttgttaggtc	atggttggtg	tggcatgggt	gggatagcgt	gttcacacag	ctatctcgtg	50220
	agtcatactc	ctccaatcca	gcctgctcgc	ttcccggtgc	tgtcatgtag	ttgtcaccct	50280
	gctatctctc	cctccagttt	ttgcagaaat	ttcctttgtc	ttcactcttg	gtcttctctc	50340
	cccatccccc	atgtatccta	tatctttctc	tttcttggtt	tatttcatca	ctcaggtgga	50400
	aaagatgctc	cagtggatta	ctgggaaaag	ggggagcatg	gatgataaag	gtattgagac	50460
50	cttacacgtc	agggaatttt	tttttttttt	tttttttgag	acggagtttt	gctcttgtcc	50520
	aggttggagt	gcagtggcgc	caactcggct	cactgcaacc	tccacctcct	gggttcaagt	50580
	gattctcctg	cctcagcctc	ctgagttagc	gggattacag	gtgcccgcga	ccaogccag	50640
	ctaatttttt	gtatttttaa	tagagacgag	gtttcactgt	gttggccagg	ctgggtcttg	50700
	actcctactt	caggcaatcc	acccacctcg	gaatgttttt	attgtccctt	ctcatttcat	50760
55	gactgctggg	ctaggtatag	aattccagaa	tcattgttct	tagaatctcg	aaggcattgc	50820
	ttcattgctg	gccagctttc	agtgttcttg	caaagtctga	agctgtgcta	atcacctcat	50880
	cctttgaaag	tgaactgttt	tttcttccca	gaaacttaca	gaacattctc	tttgtccgca	50940
	gaattctcgg	attgcaatta	ctgtgcctta	gaattgggtc	gtttttatca	ttatgaagag	51000
	tactggatgg	gtcgggaggt	tttcttgaat	tacttcttga	tggtttcttt	ccttgtattt	51060
60	ttttgtttgc	taattttcta	tttttttttc	ttggtttact	ttcttgggca	gggggatttc	51120
	ttctacttat	atttgattct	tcagttgagc	ttgtcatttt	tgctatcttg	tttttaagtt	51180
	tcgagagaca	tctttgtttt	atataacatt	ctgttcttaa	tacatagatg	caagatcttt	51240
	tctttctgag	tatattaata	tgtatttgaa	atctttctat	tctctgcagt	ttgtttcccc	51300
	caagggtttt	tttttttttc	tgggttttgt	tttttggttt	tatgttagag	actttcctgt	51360
65	tatatctggt	catcagtggt	acctgcagtg	ggtggagagt	aggggcttat	tggagtatga	51420

	gaaccttgag	caggtgtaag	gagcctgtca	acactgcgct	ggcctcaggg	cctctagggg	51480
	ggctgccagt	tgtgcattct	gaggatacct	tttgggtgtg	ccttttgtct	ggtcagatta	51540
5	tctagagatg	ctctgcctcc	tacctggagg	agaagggtct	agctgccagc	ggtgtgagtg	51600
	tctcttgggg	aaaaggactc	gagttccctg	tgtttggctt	gtgtatggcc	gcttacccca	51660
	tttttggtgg	agcgctcaca	tcttccactg	tgccaacagt	cttgctgcag	ttcatagacc	51720
	ttctggttta	catttttcca	gaaagtatgt	cttttagattt	ctgcagaagt	ctgaggagca	51780
	tggaaggagc	ttggggaatg	agatggcaat	ccaggtcttc	ccagatggct	ctacctttat	51840
10	ccoctgcagg	gaatcccact	cctccttcct	gactgggagc	acagccagag	ccttgggagg	51900
	aatctggagt	ggaaatctcg	ggcggctctg	ctttccttact	gttcacttgt	aattttgctt	51960
	tctcacaact	gccaaccact	aatcagcctg	atttccagct	tccagaattc	tattgctgtt	52020
	gtctgctctc	ctattcccac	cgtaggggat	ggggctgtct	tttttttttt	ttttaatttt	52080
	ggtaaaaacat	acaaaacata	aagtgttcca	ttttagccat	tttttaggtac	acagttcagt	52140
15	ggcagtaagt	acattcacgt	tgtgtgtatt	tgttttttta	gtaataaaca	atataaaatt	52200
	ttttaagtaa	taaaacacaa	ataaaagatt	gtttaatgtg	attatcgtgg	aatttttaggt	52260
	gtgatcagga	gccatggtgt	agtcttctgt	tgaaacaggg	tgataggatt	tgtttaccac	52320
	ctoctaggaa	agcagttgga	tagtttgttg	gcataaaaagt	acattttatc	tatttttaat	52380
	aatcgtagct	ttatagaaat	tgcaagtggg	actcccaggc	ctggcattca	aggcttcttg	52440
20	agatctgggc	taccacacca	tgtcctccag	ccgtctgtcg	cacctcctac	tgcccactca	52500
	ctgttcctgg	catgagatgt	gatctccagc	ccccatgcct	ttgctgtgca	gggtgttcca	52560
	gagtgaattg	tccctcctgt	ctgtctctct	gccctcttcc	tctgtcttcc	atcttctctg	52620
	cccacatcac	tgccctcctac	ccaaggcctg	tgtctattcc	tccctcggtt	tcccccatgg	52680
	cctggtacat	acctctgaat	tatcaccttg	catttcccat	attgccgggc	tctctttgat	52740
	gtctgtttct	ttgctgggtc	ttcctcagtg	cttgacggtc	agttaaatgt	ctttattctt	52800
25	ttttgtagga	tatccgacat	gaagccagtg	acttcccatg	tagagtggcc	aagcttccta	52860
	agaacaaaaa	ccgaaatagg	tacagagacg	tcagtccctg	taagtatcca	cgtggccggg	52920
	accagtcctg	ctcttccttt	gctgcaggcc	tttttagtca	agactccttt	cgcctcaggg	52980
	tttagtataa	taataaatca	atgtagcaga	ggtttatgac	gcgattgttt	cctatagtaa	53040
	aggcattaga	gactttatgt	aatagctcat	ttttccacca	ttatagaagg	gctcaggttt	53100
30	cagtttctgg	aaaattcagt	gaagttcaaa	gcacttttct	taagctttga	ctgtttttgt	53160
	gatgaatcat	tttccctacca	gctgaagcag	agtatagcag	gcataataaa	accttttctg	53220
	gatgactcag	cagcagcgtc	attagggcat	gagcactgtg	ttccgctgta	atgaagcccc	53280
	gcacaggcat	tccgggtggg	cactgtcgtc	ccctgcgctg	aatatgcaag	gcagctctgt	53340
	ctggagtccc	caccgcctcc	acccccgcca	acctcatcat	ttttctccct	ctttcctgtc	53400
35	gttagttctt	cctaggattg	tcagtgtgcc	tgtctggcctg	tgccagccct	gtccgccttc	53460
	tgagtgattg	gctgtcagtc	tgccggtagc	tgaaaagtaa	ataacttaac	atgttagaat	53520
	ttgcataaag	taaggaaaac	tggagctgag	tacaggactt	gaactgcgcc	atctcctcta	53580
	ggccacagag	gcctttttga	cccccttcca	ggtctttaga	cattgtcagg	cagtgggggg	53640
	tcgtagctgc	cagtgtctcc	atggtagcgt	gctctgccag	ggatgcagaa	gattctccag	53700
40	tcattcctcc	agtgggcact	tccctgcagg	ctctgtccca	tggtctggag	tgggtgctgt	53760
	cattgtttct	tgccagaagg	gttagcagtg	cactcctgac	tgacttatgt	ggcgccaga	53820
	ttcctggaag	gggtctaaaa	atggacctag	acttggtgta	gaacgtgtgc	ctcttggcct	53880
	gccaccatgg	ttccctgcct	ggttttgtgt	gtcagctctg	ccgcttaaga	actgagtggc	53940
	ttcgggcaag	ttgttctctc	tcataggagt	gtgtgaagat	gaagcaacat	aagctgctta	54000
45	gccagcggcc	cagtacctca	cgcagacata	agtgtcagtg	aaatgttgtc	tgtggtgggg	54060
	atggttgtca	ccaacatctg	aagtgcactt	ctaggtcatc	aggtgacatg	attggcgcca	54120
	acacatggta	ctcttgattt	agcacatctc	agctgaggca	cctcattgat	atttgtttaa	54180
	aaacaaaaac	aaaaaacctt	ggtgattctg	ctgtgaagtc	ctggccagaa	acctccagac	54240
	cgctgatcaa	cacgcaacag	aaccatcacc	gttcacctct	ttgacatggt	gccaggatac	54300
	cctggatctc	tagcttttgc	tatagttgct	ctaattaggg	aataatcttg	tctttaatat	54360
50	tccttttgta	cattttttta	catttcttat	ctaaatggtt	ttatgaatca	gttttacaga	54420
	gaaaaaaaac	cagtatttta	aatattcttc	caggggctgg	tccaagtaca	gtagtgttta	54480
	caactatgtg	atcacaacca	gttacagatt	tctttgttcc	ttctccatcc	ccactgcttt	54540
	acttgactag	ccaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	agttattcca	gggaaacaat	tctccaactt	54600
	tttcaactccc	aatctcactc	ctcttatctt	cctcccgtac	tcctatcctc	ctcccgtact	54660
55	cctatcctcc	tcccctactc	ctatcctcca	gtagaaacag	tcatttgctg	tgaaggttat	54720
	gggggagaat	gagtcaaggt	agaaggtcac	ctgtgcacca	gctcacagtg	ctctgtgtga	54780
	tgacagcagt	ccacagttac	aggcacttgc	tgaacgaggg	gctctgtata	cacctcagct	54840
	cattgactct	tcccacaacc	ctcttgtcac	ctaccattta	gcaaatgaaa	aaaccaaggc	54900
	tctgaggtga	gttggttgcc	cagagtcacc	cagtgtgtgt	tgaacccact	cacataacca	54960
60	accaatacca	ttatgtaatt	tttgaggtct	tttatctctg	tgatccactt	aaaaattatc	55020
	caagtatctt	tatttgtact	aagcctccat	aatgagaaac	agtgttccag	attggtggct	55080
	gttttcaaa	acatctctct	ttggaattct	cttttagaac	aaaaagcccc	agaccactta	55140
	tccccattca	tatccccttt	ggacctaggg	agaaggtact	atttataggt	gatcacctga	55200

65

5	gtttattgtc	ccttgtgctg	tgccagaaat	aaaggtcccc	acctgctctt	attagctcta	55260
	ctaacaggat	aaggaaaagt	gccctcagag	agctactgct	tttgtgacaa	acaaatgata	55320
	caagaaaaaa	aaagtggctt	tttaatttta	gtgacctggg	gcaggacttc	caaatgaaag	55380
	tttattttcta	aaaactaaaa	ggtaaattta	atatactttc	agtgtttggg	cttaaattct	55440
	ctttcaagt	tctttgtgat	atgctctgaa	ttttaaaaa	ttagaatcat	tgaagttcat	55500
	tatacttgaa	ctttaaaaaa	aaaaaacaaa	aacctcgtat	aaaggtcaag	gtatgacttc	55560
10	atgctgctgt	gtacttaggt	cattttaatct	tcaaaccact	ggatagaggt	taggttgaag	55620
	ttcgatctta	aatcctacct	actgtagctc	attgtaccag	caacagctgt	agggactagg	55680
	tggaaattcat	ggtggggttt	gttccctttt	aaagattgaa	gccaccatat	tttctgccct	55740
	ctaaaagttt	atgtcagcca	ggcatgggtg	gctcacactt	gtaatcccag	cactttgggg	55800
	aggctgaggt	gggtggatca	cttgaggcca	ggagttcgag	accagcctgg	ccaacatggg	55860
15	gaaccccat	ctctactaaa	aatagaaaaa	ttaggtgagc	atggtggcct	gcgcctgtaa	55920
	tcccagctac	tcgggaggct	gaggcagag	aaacatttga	atccgggaga	tggaggctgc	55980
	agtgaagctga	gaacatgcca	ctgcactcca	gcctgggtga	cagagtga	ctcttgactc	56040
	aaaaaataaa	gttatgcac	agagaacaga	tcctttgatg	ccctcctctg	ccctgaaagg	56100
	tttttggggg	agagtaataa	gtatcacaa	aagatatgac	ctgagaacag	atttccaga	56160
20	taggaatga	tccatgtttt	aatatggctt	actgctgttg	cttcatagtg	tgaagcttca	56220
	gacacttctg	aaaacccttt	cagaaaaatc	cagtgcgccc	atactgatga	ctaactctca	56280
	ctaaaaacag	gtttcagcca	gtgtgaatgc	cactaatgoc	accaactcac	ctttgctttt	56340
	ctgtagggtg	tgcacctgta	tgtacacatt	cagcttttcc	gggattaacc	tctgagttct	56400
	ggtttgtctt	tcagttgacc	atagtcggat	taaactacat	caagaagata	atgactatat	56460
	caaogctagt	ttgataaaaa	tggaagaagc	ccaaaggagt	tacattctta	cccaggtaag	56520
25	cagattgtct	gaatttttcta	tttaatgtca	atttaagagt	ttgagagtgc	tgttatccac	56580
	acctcaataa	aaatctgcca	catcctttag	aaggtcagga	tttcagcata	ccaaaaagca	56640
	gcaaggaagg	gggaaaaatc	atccttcaaa	ggttcagttt	gggtataaag	aacgctaata	56700
	ttttctggga	agcataagat	gacattgctg	gaaatgagag	cttatagaaa	acaacattaa	56760
	aatgccagag	ttgcctgtgt	ggtctgttgg	cagagacagc	agagccatgg	ctggaggagg	56820
30	gtctgtacct	gtgttgcttc	cagaagtatt	tgtcgtagag	cacttgtgat	ggcaaatcta	56880
	agaacgttag	cagtagacca	ggaatctctg	tccagagcca	ttcagagtga	ctcagcatgg	56940
	ttctcattct	ttggccagaa	gaaaggcatc	attggatcat	gtgaacaagc	atgaaaaatg	57000
	acttaaaatt	tctgttggct	tttggcatct	ttatggaaac	aaaatcctga	aagtggttta	57060
	ataattgagc	ctcttgtaaa	acactcagt	gcatgtgacc	aaaagggtat	ctgggaaaga	57120
35	ggataaaaa	agtttctttt	taattaatct	tctcaagtct	taacttggtt	cctgtaagtt	57180
	ggtctaaaaa	gactgggttt	cttattttgt	ttttcatcat	aatttttgtt	tctcattcca	57240
	tgtcagcttt	cagtcttata	tggcttttag	ccacagggcg	attttgaaca	tttgtaattt	57300
	tgcttaataa	ttaggaaatt	aaaattctgg	ggaagacaga	atgctctatg	aagaaaggct	57360
	gctttgagca	aggagctagg	tcagggcgcg	ttcaactgag	gcctttcttc	actgcctttt	57420
40	tgtcttgtcc	cagttcctcc	ccatttatga	ctaaaaatcag	cccagatgct	tctogtcatc	57480
	tgggatgcag	agcatcagcc	cagctgtgtt	cagtccatg	gggccattga	gtaagttctt	57540
	ggtgcattga	tacagggcag	gcctttacca	ggccctgagc	ccctggctct	ccagcagctt	57600
	ctgggggtatt	tgggggagc	tgatggggga	gggggttgat	aaggcgggag	atgtctgggg	57660
	atgaggttga	ggcaaaaagt	acttcttgag	gactttgctt	tttggaaga	tcaaatttcc	57720
	tacttcttga	tttcagccct	tcaactctgg	tatggagtca	ggaagccctt	taaatacctg	57780
45	ttgtcgggtg	tatcatgtca	agtgttgcac	tagcaaatga	ccatgtatcc	ttgtgctact	57840
	gtcctgccta	ccccgcaccc	tagcgcttcc	ttgggacatg	agaagctctg	tctgggttgt	57900
	gaggtggcac	tggggatgtt	gagaaaactgt	ttacacagtt	tccctttgcc	ctggggattt	57960
	actaaaggag	tcgaggcagc	ctgaccccaa	agcatcacc	ctggacacta	tgaccgaaac	58020
	atttccccag	tgcccaaac	aagaacaccc	ttcccatttt	tttttcagt	gtgttcatta	58080
50	tgtataata	caagtctctc	ttctcatttt	ttaaaagtca	gaagtacaga	agagcagaga	58140
	ataatgtcca	aggggcccct	cttcacctcc	cccgtgcagt	gtcagctaag	tgtgggtgct	58200
	gtccttgacg	atcttagggg	attgtgatcc	ttcagaccat	tctaaactgg	ggtgggtgct	58260
	ggagttaggg	aaggcatgaa	gggagttagt	gagagctgca	gtgactgggg	tcttcatgcc	58320
	agggtggaga	atgcaaggcc	caggtggcca	gccatgtgcc	acgggatttc	tggctgccaa	58380
	gagctgttta	tctgttcaact	ggggagggaa	gagttaaaatg	tggctgctct	ttctccgagt	58440
55	cccttcagca	cagggagtgc	tgacttgtct	tgttcaggtg	gtaagttcaa	gatgagctca	58500
	ggaaagaaag	tgagaggaca	ctgagggcta	gtggttgagc	caagtgtgat	gggacttaaa	58560
	gggagaagat	ttaaagaata	aggagcttat	gggcccggga	cgggtggctta	cgctgtaat	58620
	cccagcactt	tgggaggctg	aagcaggtgg	atcacttggg	tcaggagttc	gaggccagcc	58680
	tggccaacat	ggtgaaaccc	cgtctctact	aaaaatacag	aaattagctg	ggtgtggtag	58740
60	tgtgcacctg	taatcccagc	tacttgggag	gctgagacag	gagaatcgct	tgagcccag	58800
	aggcagaggt	tcagattgcg	cccctgtact	ccagcctggg	ccagcctggg	tgatggagcg	58860
	agactctgcc	tcaaaaaaaa	ttaaaaaaa	ataaagaggt	taggtgaaaa	tagatgagaa	58920
	tggaaaccat	gagaagaagt	gatgctggcc	aaggacatga	caggttctga	tgtggagggtg	58980

5	ataggcaatg	tctcttccag	ccactgctaa	taattgagac	aaactcaagg	cattcatacc	59040
	ctgtgtccag	taaacaatctg	tgcccattgc	caggtgagct	ggattgaaat	gggccagctg	59100
	ctcagcagac	accctcatgc	cccagtgaat	ctgttcccct	tgggccacct	cattgacat	59160
	ttatgtttct	acatctccta	agtttgttgg	gccaaggatg	gaggtgtct	gccgtcaggg	59220
	tctcattgct	tgatggtagg	aatagttgct	gatgtttcat	tggatgttgc	tgtattctag	59280
10	ggactgtgct	aagtacttta	tagaaatgaa	catacttcat	tttcacagtt	ttatgaatag	59340
	ggactattat	tagtcaagta	agcgatgggg	aaactggggc	agggagcgat	gaagtgaact	59400
	gcgcaaggtc	acaagatgat	gtgattggaa	ccaagagaag	tgttgtgggt	ggccacgccc	59460
	ccacactgcc	tctcatctgc	accaaggagt	tttgtcccat	agcccaaggg	ccttggggac	59520
	gaatctcagt	ggaggccctt	agcgggcctg	cctgagccag	aaagcagaat	cggcattttt	59580
	ctgtccttgg	ttggcccagc	cctgaactga	gatgcccga	tcgcctttcg	ctgccttgga	59640
15	gaaaatggag	ctgcagttac	tgaccaccag	gcagagagag	gtgggtccct	gtcccagcct	59700
	cagccaccac	tctgcctaag	ctgtggggac	tgaggcgct	gtcgttagct	gactgcagaa	59760
	ggtgagcaca	cgctgtagca	tgttatgttt	cagatgtcac	atgttgtgtt	atttgttctt	59820
	tgaggggccc	tttgccctaac	acatgcggtc	acttttggga	gatggtgtgg	gagcagaaaa	59880
	gcaggggtgt	cgatcatgctc	aacagagtga	tggagaaagg	ttcggtaagt	ctcggcttca	59940
20	tttgtgtgtg	atgtgatcat	gcataccact	ccatagatt	accattttcg	tccagatttt	60000
	taaatatttt	ttcttgccct	tgtatttctt	ttacgtagta	tttttattta	aaaaaattaa	60060
	aacagcagca	tataaatgca	tgttggttgt	caaccagtta	atgaagtga	taaaaggagg	60120
	gaggcggaag	aactgcacgg	acctcttcgc	ccccgccttc	tcctgtgtgg	tgcgtgtggc	60180
	gctccgccc	cctgtgctgc	ctgtgcggtc	ctcatcacag	tgtggagttg	tgtgtggagt	60240
25	tatggagacc	tgctttttatc	ttgaaaagca	agttcttagt	gcactttcat	ggtgtctgat	60300
	tttttggctg	gtgagagtgt	gttctacctc	gcggagctgt	gggagcggct	gactgatga	60360
	gatttgcctc	cattcagtag	ctagactcct	gccctgccac	acctcttcgg	agtgcagatt	60420
	gacttcagga	tgtgtgtcat	tctaagtcc	tgcaactttt	caaacacccc	tcgggctagc	60480
	gtgtggctgc	acggtgtcca	tttgtgcagg	ccaccactcc	tcttgcactc	gggtctagcc	60540
	acctctcctt	cttgacttac	catagttcat	tttgtaccat	gctttcagaa	tgagctttct	60600
30	caaatccaa	tctcaccacg	gttcttccca	cttgaaaacc	cttgtgcggt	tccttttggc	60660
	tcacaggata	atacatggtg	tggtttacgg	aacctgcag	gtctggccct	agggccctgg	60720
	acacagacct	ctcaccactc	ttggaacttt	agccaggaca	aagttttctg	tttttagttt	60780
	cttaccatgt	tctctggggc	gaggagtccc	agtgcacacg	ttcatccac	ttgcaggcac	60840
	ccctggacgg	ctgccccag	ctcccaact	gcctgcattc	tcacctgccc	tcctcactct	60900
35	gttggaaatag	ctgagaatag	cagatttctg	ggcagccggc	ctcctgtgta	gactgtcctg	60960
	tgtagactgt	cctgtgtaga	ttgtctgtgt	agactgtcct	gtgtagattg	tctgtgtaga	61020
	ctgtcctgtg	tagactgtcc	atgtaaactg	tcctgtgtag	attgtctgtg	tagactgtcc	61080
	tgtgtagact	gtcctgtgta	gattgtctgt	gtagactgtc	tctgtagacc	gtcgtgtata	61140
	gactgtcctg	tgtagactgt	ctctgtagac	cgctgtgtat	agactgtcct	gtgtagactg	61200
40	tctctgtaga	cogtctgtgt	tagattgtct	gtgtagacca	tcctgtgtag	accatcccat	61260
	ttagaccatc	tgctgtgtga	ggcgagggcc	agtgttcagc	agggccacag	gctcctcggc	61320
	ctccctgccc	tcgtgtctcc	ccaacactgc	caaccctgct	gcgggggtcca	ggaggagatg	61380
	ggctgaggat	cgtggagacc	agcaggagcg	tgtggcccag	gagcagggaa	ctgggtgtcc	61440
	ttgggccttg	ccaggtccag	gctcagctag	gacacggctc	tcacagctgt	cctgggttgc	61500
45	tcgggcacaca	gaagaagggtg	agggctccag	aaggccacc	tttccaaaa	aagcagatc	61560
	atggccctag	aatgtaaaaa	atccaagtgt	taagaaggaa	cacatcaaa	gaaacttcag	61620
	cagtgaatac	ttgaagcatt	aaccacgaag	cctctgcctc	caccacacac	aaagaaacgg	61680
	ctttagttac	tcgcagaaa	tcttctctct	aggacagcgc	gtgtttaaaa	tcataagggt	61740
	ttggtttgtt	ttgttttggg	gttgggggtt	tttgggggtt	ttttaccctt	gcctactttt	61800
	taaaaaaatga	aagtgtttat	ttgcccacaa	ataacagaca	gggagcttgc	ctaagtgttc	61860
50	tgttgatgat	ataatgtatc	ttgtcttaga	aaaaaacttt	ttcagtga	ggtgtgtttt	61920
	aaattttttc	ttccctcctt	agtagcttga	ttagtataat	gtgaagttac	aaatgtgaag	61980
	caaaacccca	cccttcacca	ctagtcagca	attttgagta	aagaaacaaa	gcatacaggt	62040
	ctcacagcac	acactgtctt	agagggaagg	ggaagcctgg	tggcctgtgg	aagccttcag	62100
	catagctcca	tctgcagggt	tctgacccct	agcactactg	acacttgggc	tggatcattg	62160
55	tctgtctagg	atccgggcag	ggagtggctg	tgctgggcgc	tgtagggaag	ttagcagcat	62220
	ctctggcctc	tatccaccag	atgccagtag	cacccctccc	ccagatgtgg	cagtcagatg	62280
	tgtttctgtc	tagactccag	actttgtcca	acgtccctcg	gtaggccaaa	ttgcccccg	62340
	ttgagaacca	ccgtcttaga	tggtatttag	ggttgggaat	tttaaatcaa	gacatttatt	62400
	cagaaattac	cagatatagt	agcatttgc	tcttatttat	ttctttgttg	tcaagtgttt	62460
	ggcaaaacct	ctttgtctgtg	agcacaaggt	ttgcttttag	aattgttgtc	acattacagc	62520
60	aaggagtgg	gtccagcgct	gtagttaggt	atgttagcag	tgtccagtc	tgtagttagt	62580
	tgttccagcc	tcaccaggcc	ctgtgcttca	ttgtctccca	ctcaagactg	accacaaatg	62640
	gccacagat	ccactgtgac	aacctttccc	tttgggttac	tgtgtgggca	tcgagaacat	62700
	ggctgggttg	ctttgctgta	gtttactgtg	ataactgtgc	cagcagtc	tgttttctt	62760

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

tgttaagtat	cccattccac	tggaggatta	cttgggctg	cagattggca	tgaaaagcaa	62820
tgtatggttt	gagattgtta	aagtttcttt	gggatcaaca	ttttcaattc	tgtatcagca	62880
ttatccctcc	cagagggctg	gctgggagaa	atcatgagaa	gttacagtat	cttatttgct	62940
cagctaactct	aattataaat	gatccacaca	gcttgtggtg	aaaccagctt	ttggggagtt	63000
ttcattttaat	gcataacttg	cttctgattt	ccttccttca	ccaaatagtg	taggatgctc	63060
cctcttattt	ttggcaaaaca	tgctgtttat	cttttgggac	cctgggcttc	ctggaaacca	63120
gttatgcaga	agatgattgt	gtgtgttaga	ctggggtcat	ccagatggct	agagttctca	63180
ctgggtctgt	ttaaggattg	acttttagaca	cctcagtgta	ggctgcacca	tggcgttaagg	63240
gttgggattg	ttgttttagaa	gggggaagta	agcaaggtag	gtttaattgg	ccattgcaga	63300
atctcaccog	tatctccctc	ctgaaatcct	cactaaagct	gccgtttgct	ttcagggtgct	63360
ttcatgcaca	agacactgca	ttttgtatca	caggggtccat	ataattcatt	tttctctcgt	63420
acttagttct	ctgtgttaag	aattactttac	ttagttctct	gtgttaataa	tttttggcga	63480
aaccaaatta	cccgctcacag	ggttactgta	gatgtctttc	atagggtttc	caaaccaccac	63540
ttgtgggattg	gtttgggaag	gccccaaagga	ctgttttaaca	tctgccttca	tggtggaaac	63600
agcaactatg	agagatgcta	gcattgtggc	actgccatgt	tcctctggta	ccagcccaag	63660
ataggactca	atlttagggcc	tggtgaagta	ctgtgttcta	ataaaaaatcc	atctactttt	63720
catggccgta	tatatcaatg	taatatgggtg	actggaaatg	tgatcttggtg	cctttttaaaa	63780
atlttgtgtg	tttaaaaacaa	aaatltctat	tggaaatgac	agagcatagc	ttgttgotgt	63840
agacacctga	gagtccttaa	aaataaatat	tgggttatgt	acacttagtt	gcattgacaga	63900
attcctcact	tgtacagttc	caaagtctta	gtctttaccc	agattacaga	gggttattaa	63960
gcattaggtt	tggttttgaa	agtgagtgtc	tgctgtctgg	aggtgagctt	taagactcgt	64020
ctgccctgct	tatgagatga	ggaaggggtg	cctcttcctc	ctgcatttct	gttctctcgt	64080
tccttctctg	tctgctcact	ctgtggaatg	cccccccgag	cacgggtggg	gtggaacctg	64140
tcagatcagt	ctottgtttc	tgggtctctg	aggcattata	agatctagtt	tttagaagtg	64200
tgggattaat	tcattctttc	acattctctc	aagttcctgc	ttttagctgc	cacacccact	64260
ttggctaagt	gggggtcttg	ccatgtaatt	agcgcctcca	tgccaaagtgg	cagaattgct	64320
tcaatggtga	cagattgtcc	ccattcaaga	gttccacttt	ggcaactcat	cattgatcca	64380
ggaaggtgac	atggatgaaa	ctggctaaga	cttcagacag	gcttgtgtcc	agactcttga	64440
gaaagctctg	ttggcttctg	gtctggcact	gtgaagtttg	ctgtgatgct	ggcaccacaa	64500
cctggtgttt	cctaatttgt	ttctcccaca	ttttgctttg	gttttgtctt	ttgggcagct	64560
tcagctcca	gtagagcagg	accaataggc	atlttgtggt	ctatattcac	cctcctcacg	64620
tgcttctctg	ctcctcattg	cccccagatg	atgccacagg	tccttgggct	tgctgccagt	64680
cgtctgtgat	ctgggcctct	gctggccctc	ctctcagctg	ctcttttctg	cctcttattt	64740
gcagtcactg	cctaggaaat	cctagtcact	cttcaaaaacc	tgctcttctg	cagagctttt	64800
ctctgatctc	tccttttctg	aaccttggct	gacctgaaac	atltccctct	tctgaattcc	64860
tgctgcatgt	cogtagcatt	tcctccctcag	ccctccccc	tagtccacct	tgtcactgct	64920
gggcacagca	gtgtcttctg	acagacagct	ggccctgaag	tggttccctt	cacccacacc	64980
atcctttgcc	ccagaggagg	tattgagtg	gtcagtgac	gtgaactgcc	agtgctattt	65040
gccaaagagc	tgttgacaca	cgtgacatt	tcctttgctg	aaaatcataa	gggctttgag	65100
cttccctctg	tcaggcaca	tggtcaggct	gacctgtag	ctctgcccct	gctgacctgc	65160
catttttctg	cacaacagtt	atccatgagc	agaaacattt	gtgtaactga	ggcagaaaact	65220
tagttcaagt	aaaatgtcac	taaatctcag	tcagtttttg	tccttagacct	taaatgaaac	65280
caaattttca	taaattttct	tgtttttaag	aaaaatttaa	tgagctacat	ttaaactgag	65340
aacatcagat	agtgtctgag	attatcaaaa	tagaacatca	aaagtatttt	tctgaatgaa	65400
ctgaacccaa	ccagaatgaa	aggccaagcc	ctggggagcc	tgtctccaag	ccttctctga	65460
aaggaggtct	gtatttggtg	ataactgtct	agcctctcca	aagggcctca	cctgctgtct	65520
ctcccagttt	tatttttaat	tgctgtgag	ttttctgtgc	agggttaaggc	acctacattc	65580
tatgccagca	gctgtatcag	gtcctgggta	atgtttgaaa	tggctacaca	gaggagtttc	65640
aaagcctttt	gttcaatctg	gcttcacctc	gtagacggtg	agaaagcgtc	agagccctgc	65700
aggatccctg	tgccacgttt	gaccggggag	ccgatgggtt	tggaaagtctg	agccctgtct	65760
gcacaacctg	ccccggctcag	cagcttctg	ccccacccc	catctcccca	tgaagcaggc	65820
atctgtgtg	accatggctt	ccatgttcag	aaacccccag	gcocttgagt	tatcatgaag	65880
cttgtgggat	gtgtctcaag	cctcctgcca	tagaaaaaact	gccatattgc	tcacaataat	65940
tcactattat	ttgtttcccc	agttaaaatg	cgcacaatac	tggccacaaa	aagaagaaaa	66000
agagatgatc	tttgaagaca	caaatttgaa	attaacattg	atctctgaag	atatcaagtc	66060
atattataca	gtgcgacagc	tagaattgga	aaaccttaca	gtgagtatag	cacacacttc	66120
agcacttcag	gcggtactg	gttcacatgc	ctcttccctt	atcccttggg	tgatattacc	66180
taattgtcagt	gttcctggct	ttgtataacc	ccgagcaaga	tgtggtttgg	gcagctgggt	66240
gagcggagct	tacttgtgta	cctaccaagt	gcccaggagg	gggtggaggcc	acagtgtctc	66300
ctctgacctt	taacaacagt	taacaccagt	tcttagggaa	aggagagttt	cttaccacaa	66360
agactggttc	ctgcttgtgc	agctgcagag	ggactggagc	ggcagcctgc	aagtccagct	66420
gaagcatgct	gccttctttg	tggtcctcag	tcttcagagc	tgaagagagg	gaagaagggg	66480
tataggggct	cactccagtt	tcatagctag	tgaaggtttt	ctgggcccag	tcttggggtt	66540

5	ttttgttgtg	ggaagagttt	ataacaccag	ctacttgctt	ggtaaaagtt	ggctcttgaa	66600
	catggcaagg	cattgtggca	agcagcactg	ccgctgaacg	cgctgctcct	ggggctttgg	66660
	aataattccc	ctggatccgt	aacttggggg	tgttcatgtc	attctgggga	acagtggagg	66720
	gagtgcgogg	cagcacctgg	gggcaccagt	gaagagtggc	cagccacca	cctctagaac	66780
	ctaactgggg	tcgaatcctg	gccccacctt	actagctcat	cacagtgtct	ccgtttcctc	66840
10	ttctgtcaaa	ctcaggtttt	gcgagggttc	tgggaggttc	tacacgggaa	gggttagcag	66900
	ttaccatggg	tgtgtagcac	gggctttatc	tgaagggaag	gtggagccgt	agggagacca	66960
	tgtggagtgg	ggctccaggg	ctgtgtgggt	ggggagggat	ctgcttctgg	gttaccat	67020
	gcctcccctt	ctcaagtact	actttttaat	catcatggct	cctgccattc	atttcatagt	67080
	tgatgtaagc	caggtgcggg	ggctcacgtc	tttaatccca	gcaactgggg	aggctgaggc	67140
15	caggaggatc	actcgaggcc	aggagttcaa	gaccagcttg	ggcaacatag	tgagaccccc	67200
	gtctctacaa	aaaaacaaaa	acagtttagtc	agacatcggt	gtgctcccct	atagtcacgc	67260
	tactcaggag	gctgaggcag	gaggattgct	tgtgccgggg	agttcaaggc	tgcagtgagc	67320
	tatgcttgca	ccactgcact	ctagcctggg	tgcacagagc	agaccctgtc	tcaaaaataa	67380
	ataaataaaa	aaaatagtag	aagtaagatc	tagaatgtag	cacagggttac	caggacgtag	67440
20	gcaagggggt	cgggctgctt	ggctcttgag	gatggtagca	gtgcagctga	tgtgagtgtc	67500
	ttctgccttc	tgggtgtgac	cgcgccggag	tcaccaggcc	tgccatagcc	ctgatggggc	67560
	agaggggttc	gagtacgggt	gatggagggt	ctttctggaa	gattctcagg	agtaacatgg	67620
	gcagtgtggt	ggaatgtgct	agaggattta	tgcagtagcc	ttttaaaaga	atgcttttta	67680
	gcatttgcaa	gcctgacatt	aagagtgact	tctgggaaac	tatttgcttg	ttgagggaaa	67740
25	ctgaatttca	acagagcaga	agagctgtgc	gctttttgct	tggcagagtg	aatacacgcca	67800
	gctcagaggt	tttgatgtta	ggatctgttt	gctccaacag	actttgtttt	taaaaggctt	67860
	ttctcagcca	tactgtctgt	ttctagcaca	aggtctggaat	gagttccttg	tgaagagggt	67920
	gagcaggtgt	gagggagggt	gtcagtgggc	ggtaaccac	accttcaagg	attaaaggaa	67980
	aacttgcatt	tggcatgctt	gcttcttatt	caattttaaa	atacatttta	acggccgggc	68040
30	acggtggcta	acacctgtaa	tcccagcact	ttgaggggct	gaggtgggtg	gttcacgagg	68100
	ccagggggtc	aagaccagcc	tggccaagat	ggtgaaaccc	catctctact	aaaaatacaa	68160
	aaaaaataaa	aattagccgg	gcgtgggtgg	gggcacctgt	aatcccagct	actcgggagg	68220
	ctgaggcaga	gaattgtctg	aaccacggag	gcggagggtt	cattgagccg	agatcatgcc	68280
	actgcattcc	agcctggggc	gcagagcaag	actctgtctc	aaaataataa	taataatttt	68340
35	ttaaaaatac	attttaagtc	cttttcttcc	ccacctgcct	ccaccaccca	aatagaagag	68400
	gtatttcttc	ttctttaatg	tcattaaggt	tatatggata	ccattttcta	gagaggaaaag	68460
	aatgatggaa	tgtcctagt	tgagtctagc	aattatccta	acatacacaa	atttctcctt	68520
	ttctgtgcc	aagatactgt	atttaatat	taagtgaact	taaatattat	ttactagtgt	68580
	atttaatggc	tgaggcaggg	ttaaatatgt	attattttca	tcccagcaga	gttggggggg	68640
40	gtcctagtaa	ctatgccatg	agctctgtga	gggtgagggt	gtgtctttgc	ccccgcctcc	68700
	ctggcacagt	gactggcaca	tgattggcat	agtgtggaca	ttcgtcaagt	gaaggaaggc	68760
	atcatgagca	gatctctggc	ctgaatcctt	ctgccatcag	ctgctcgcca	ggtggccctg	68820
	gcactggggc	acagggaac	tctccaggct	ggatagtgtt	ctgtctgtgg	ctgtcttccc	68880
	ggggccatgt	taggagactt	tcacttccag	agccctttcc	ctctcagggg	cttgcttacc	68940
45	aagtgactgg	ttcccattta	ctaggagctc	ttagggtcatt	gaagatgttg	cgtactcccc	69000
	ccagtgaggg	ctgccttttg	atcacagccg	ccagaagcct	caaggaagga	gcagagctgg	69060
	aaacagacgc	caggccattg	cttctgttcc	tctggggcag	accagccac	ggaagagaca	69120
	ttctgggaca	agggctgggg	tccaccttcc	aaacgtgtct	gcagcaggct	ctcagcatgg	69180
	actctctgcc	tccaaacatc	cacctctca	tcgggaaaatg	gatgggagtg	cctgcctgga	69240
50	gcagctgggt	ggagagcgca	gcgccagcac	gtaggacaca	ctcggttcat	gggctgatgc	69300
	cgttcgcatt	gactgcctct	tcagctgggt	gttgagccac	accttggagt	caccagtctt	69360
	tggagaccaa	gtctgtact	ttttctctca	aagtgacaat	cctctgaaac	ctccagatca	69420
	tcttgaagcc	cccgctctgaa	agttgccag	agccagtgcc	tcacctgctg	ttccttgttc	69480
	actttttcac	gggaggcctt	gcagggcttt	atgacaagat	tttatgggtg	gotgccagc	69540
55	actcatttga	ctctgtagac	agagagaaac	catgttgaac	ctatgataga	gtggaaagtga	69600
	tagggagaaa	agaggtgagg	ggactcttca	atccgaaggg	aaatgaagtc	taagcaggcg	69660
	cacctgtcag	gttcagtgtc	aagcccaggg	cctggcccca	gggtgtggta	tttgttgact	69720
	gggtgtgtgg	accctggggag	aaagtctgag	aatgaatgtt	cctcttagag	gtagagagtg	69780
	gaaggtgact	ctgtgtgtac	ttggaattag	tgaattctgt	acagatgatt	cttttagaat	69840
60	catcat						

	gcctcagggga	gcttccagtc	atggtggaag	gtgaagggga	gcaggagcaa	gagatggggg	70380
	aggtcccaga	ctcttaacca	gctctcttgt	gaatgcattg	cctcagggag	ggcaccgaagc	70440
5	ctttcatgag	ggacctgtcc	ccctgaccca	gacacctccc	acccagcccc	acctccaaca	70500
	ctagggatca	catttcagca	tgagattggg	aggggacaga	catctaacgg	tgttattaac	70560
	gttgcccttg	agaattggac	ctggctgact	tatatctcct	ctctggcttt	cagatggaca	70620
	agaggaaaga	cccttcttcc	gttgatatca	agaaagtgtc	gttagaaatg	aggaagtttc	70680
10	ggatggggct	gatccagaca	gccgaccagc	tgcgcttctc	ctacctggct	gtgatcgaag	70740
	gtgccaaatt	catcatgggg	gactcttccg	tgcaggtcag	cattgccttt	gtttgaatcc	70800
	aggtgtgacc	attttaactt	ttttgtcttt	gaaggaggct	gtcagttgta	aaagttcaaa	70860
	caccgtctgg	tgtcagggga	aatagctacc	cttcatgttt	aaaatagcta	gaaagttgtc	70920
	aaaatgttca	ccatgttgca	ctttgtgcct	ttgaagtgtc	cacatagaga	gcattgatag	70980
15	gaagacgaga	ctttattttc	aaaagatttc	atcttccaag	tacatggctg	cagccttgag	71040
	aggccgagag	ccctctgcca	agccgtcacc	tctgtcatg	caaagggttt	tcctgacaaa	71100
	ccagccgaag	tgaacactaa	taggacttcc	tcttgctgct	ctttcaagga	tcagtgggaag	71160
	gagctttccc	acgaggacct	ggagccccc	cccagacata	tccccccacc	tccccggcca	71220
	cccaaacgaa	tcctggagcc	acacaatggg	aaatgcaggg	agttcttccc	aaatcaccag	71280
20	tgggtgaagg	aagagaccca	ggaggataaa	gactgcccc	tcaaggaaga	aaaaggaagc	71340
	cccttaaatg	ccgcacccta	cggcatcgaa	aggtaatatg	attgggtccc	agcttgttg	71400
	ggtgagggga	aatgactttc	tgttctagaa	acacacgctg	gtactgaaac	cctgtggatg	71460
	cagcctcctg	ttggcaagca	gcgcttccgc	atccttgggg	aacagggcgc	gtggaccaca	71520
	gccactccac	tcctggctgc	tggaggtccg	gtattgggca	caggggtggc	gcaggacatg	71580
25	agccacttct	gtgggcttct	agtgccacct	tgtggtgctt	gttggaatga	ggggctcgga	71640
	gccaccgagt	agggtttttc	tgccccccct	gacgacagcg	ccctccccca	ggtttccgga	71700
	cagtcctgaa	atgtgatgtc	caggcttgag	tgccttcagt	ccccacagt	gtcctttggg	71760
	gaatgttaacc	ttttttatgt	ggtcttgatt	aaatcccatt	ttacttccct	gcaggttaac	71820
	aaccattatt	gagtacctat	tgatatgtgt	ggtgtactga	gttaactaga	acatgtcccc	71880
30	tggtctgtgt	tctagaccat	cttgctggga	aaaaggcaga	cccaaagcat	attttggttg	71940
	gggcccatgg	acagtgatgt	gatagaggtg	tccgctgagg	tggtcaggga	aggctgcttg	72000
	cagtagggtg	ccgtgcacgg	aaagtttgca	gaatgagcag	gtgttagttc	cagctggaga	72060
	tgactgccgg	ctgtgccctt	ggtacctgtc	ttctggaggg	aagttttaag	acgtgtgcac	72120
	acttgaccca	gcagttgtat	acatggagaa	atttactttg	cagcaactct	caaaacaagc	72180
35	gtgtaaaagt	gtgtataggt	agttgtgttt	gttgtggcat	tgttttagt	agtgaataat	72240
	tagagacagg	ccaatgatat	aaccagggac	ctgatcaatt	atgttctctc	ccggtgttg	72300
	gatattctgt	agctcttaaa	gaatgagatc	tgggtgtact	gatgtggcca	gacattgcaa	72360
	ttgcagtaca	tgagaaggca	aatcatacag	tagtgtgtac	accagtga	cctccagcca	72420
	gataaatcct	cacagtga	agtcgccag	gcacctgtg	aacctaccc	tgggtgtggg	72480
40	tgctatctga	agtagctggg	ggaggggtg	acaagtggac	ttcaggctga	tgtgggcttc	72540
	ggcctggccc	tccctccaag	cagagggggc	tggctcgctg	gaaggtaac	atcatccaac	72600
	tctgtctaca	cgtggcttgt	tttttccctg	aattcctgcc	acaatagcag	catccttgcc	72660
	attcattttc	tccaaagtga	gtaaccctac	tctgccctct	gattcctcag	catgagtcac	72720
	gacactgaag	ttagaagtgc	ggtcgtgggg	ggaagtcttc	gaggtgccc	ggctgcctcc	72780
45	ccagccaaag	gggagccgtc	actgcccgag	aggacgag	accatgcact	gagttactgg	72840
	aagcctcttc	tggtcaacct	gtgcgtggct	acggctctca	cggccggcgc	ttacctctgc	72900
	tacagggat	gtttccactg	acagacggc	tggcgagatg	ctcgtgtgca	gagagcactg	72960
	gccgtagcc	cgatggtagg	attcagttct	gtggtgcac	tgagccagtc	tcagaagaaa	73020
50	cagatcaaag	gtttttaaag	tctggaactg	tggaaaggct	aacaagagaa	ttaaggatcg	73080
	atgactggg	gttttaaggga	gccctctggt	cccaagaata	taagagtcta	atctcagggc	73140
	cttaacctat	tcaggagtaa	gtagagaaaa	tgccaaatac	gtctgtttct	ctctctcttt	73200
	ttttttttat	tcctttgttt	ttggaaaaaa	atagagttac	aacacattgt	tgtttttaac	73260
55	ctttataaaa	agcagctttt	tgttatttct	ggaacaaaaa	aaaacaaagt	aggcacttat	73320
	gaaactttct	cataccctta	ggtgatgtaa	tcagccatat	aatttatatt	tgatttccca	73380
	gggaagggaat	cccaaacttt	tacgaatgta	aactcccttg	gagaagaggg	ttaggacgct	73440
	gttgcgctca	agccccctc	agctgtgtgc	acactgagcc	aggacagggt	ctttgagctt	73500
60	tcccactata	agaagaacag	caacaaaagg	cgtctagaa	aaacagaacc	tgccctctgt	73560
	tctgctcagg	gtgtccccgc	tgggtttcca	ttgtcctttc	tccattgtct	cctcctgtga	73620
	cagccatctt	gctcatgtac	cagccctcat	caccccatcc	ccataaatgg	gtgtcctcga	73680
	ggcctctgcc	tgggggtcag	aggtcaccac	aggggtggcca	ttggcatgtc	aacccgctgt	73740
	taattcagag	aagtgggctc	cacctcattg	ggagaagtgc	catttcagca	gaaattcaca	73800
65	cgttagacgt	gtgtgtctgt	taagtaaggg	gaagagagag	gactagcctc	agagctctgg	73860
	ccatggaaat	gacctcctaa	gactttttcg	tggtttttaa	tattttacct	ctttccagggt	73920
	ggcatctgag	tacatcagat	tggttttgcaa	aatgcaaaaca	attttttccct	tggggatgat	73980
	ttttggggag	agggggctac	tgtaaaaaat	aaaacaaaaa	ccccctttgc	tccctcggag	74040
	gttgaagttg	ccgggggggtg	tggccgggggt	catgcatgag	gcgacagctc	tgccaggtgcg	74100

5	ggctctgggct	catctgaact	gtttggtttc	attccagttc	ctgttcaaca	gcaacacata	74160
	gcctgaccct	cctccactcc	acctccaccc	actgtccgcc	tctgcccgc	gagcccacgc	74220
	ccgactagca	ggcatgccgc	ggtaggtaag	ggccgccgga	ccgcgtagag	agccgggccc	74280
	cggacggacg	ttggtttctgc	actaaaaccc	atcttccccg	gatgtgtgtc	tcacccctca	74340
10	tccttttact	ttttgcccct	tccactttga	gtaccaaate	cacaagccat	tttttgagga	74400
	gagtgaaga	gagtaccatg	ctggcggcgc	agagggaagg	ggcctacacc	cgtcttgggg	74460
	ctcgccccac	ccagggctcc	ctcctggagc	atcccaggcg	ggcggcacgc	caacagcccc	74520
	ccccctgaat	ctgcagggag	caactctcca	ctccatattt	atttaaacia	ttttttcccc	74580
	aaaggcatcc	atagtgcact	agcattttct	tgaaccaata	atgtattaaa	attttttgat	74640
	gtcagccttg	catcaagggc	tttatcaaaa	agtacaataa	taaactcctca	ggtagtactg	74700
15	ggaatggaag	gctttgccat	gggcctgctg	cgtcagacca	gtactgggaa	ggaggacggt	74760
	tgtaagcagt	tggtatttag	tgatattgtg	ggtaacgtga	gaagatagaa	caatgctata	74820
	atatataatg	aacacgtggg	tatttaataa	gaaacatgat	gtgagattac	tttgtccgcg	74880
	ttattctcct	ccctgttatc	tgctagatct	agttctcaat	cactgctccc	ccgtgtgtat	74940
	tagaatgcat	gtaaggtctt	cttgtgtcct	gatgaaaaat	atgtgcttga	aatgagaaac	75000
20	tttgatctct	gcttactaat	gtgccccatg	tccaaagtcca	acctgcctgt	gcattgacctg	75060
	atcattacat	ggctgtgggt	cctaagcctg	ttgctgaagt	cattgtcgct	cagcaatagg	75120
	gtgcagtttt	ccaggaatag	gcatttgcct	aattcctggc	atgacactct	agtgacttcc	75180
	tggtgagggc	cagcctgtcc	tggtacagca	gggtccttgt	gtaactcaga	cattccaagg	75240
	gtatgggaag	ccatattcac	acctcacgct	ctggacatga	tttagggaag	cagggacacc	75300
25	ccccgcccc	cacctttggg	atcagcctcc	gccattccaa	gtcaacactc	ttcttgagca	75360
	gaccgtgatt	tggaagagag	gcacctgctg	gaaaccacac	ttcttgaaac	agcctgggtg	75420
	acggtccttt	aggcagcctg	ccgcctgtct	tgtcccgggt	caccttgccg	agagaggcgc	75480
	gtctgcccc	ccctcaaacc	ctgtggggcg	tgtagggtgt	cacgactctt	cctgcaaagg	75540
	gaactgaaga	cctccacatt	aagtggcttt	tttaacatgaa	aaacacggca	gctcattatt	75600
30	ccgagctact	ctcttgccag	cattttcaca	ttttgccttt	ctcgtggtag	aagccagtac	75660
	agagaaattc	tgtggtggga	acattcgagg	tgtcacctct	cagagctatg	gtgaggtgtg	75720
	gataaggctt	aggtgccagg	ctgtaagcat	tctgagctgg	gcttgttgtt	tttaagtccct	75780
	gtatatgtat	gtagtgtttt	gggtgtgtat	atatagtatg	atttcaaaat	ggacgtactg	75840
	gtttaaacct	ctatccttgg	agagcagctg	gctctccacc	ttgttacaca	ttatgttaga	75900
35	gaggtagcga	gctgtctctg	tatatgcctt	aagcccaatat	ttactcatca	ggtcattatt	75960
	ttttacaatg	gccatggaat	aaaccatttt	tacaaaaata	aaaacaaaaa	aagcaagggtg	76020
	ttttggtata	ataccttttc	aggtgtgtgt	ggatacgtgg	ctgcatgacc	gggtgggtgg	76080
	gggggagtg	ctcagggctc	tctgtgacct	cacagaactg	tcagactgta	cagttttcca	76140
	acttgccata	ttcatgatgg	gtttgcattt	tagctgcaac	aataaaaattt	ttttctaaag	76200
40	aacatgaatt	tgggggtgct	cccatttttt	tctttgctta	atagagctaa	accaggatga	76260
	gttaactcctg	tttctttcta	tccctgtctg	tcgtgaaacag	atgttgtcaa	tcagctgggg	76320
	tttagagtttt	ccacttctaa	gaattaacct	cagcatccct	gcattgccag	cacctcagg	76380
	ctggagcgtc	ttccttgact	gtgagcttgt	tgaacacctt	aggcctcagc	ccatttccct	76440
	cccaaattga	cgctttgcoct	gtgtaggggc	ctcagataac	tttaacaaact	taccagtgtt	76500
45	gtttgaagaa	cagtgttttg	agttgtaatc	tcaaaaacct	atcccttacc	caattacctg	76560
	taagacacaa	tggttaccac	atctcagtag	gtaaagtcca	cttgatatag	atttgactta	76620
	gaaataagac	agattagtag	agtttttcat	tttgtgtacaa	aattaaacaa	tgttaaatcc	76680
	ccccaaagt	atttttttga	ctttttgaag	taattttgga	cttgcaaaat	gttgccaaaa	76740
	tagtaocgaag	agttccccag	taccctcgaa	gtttcctoga	ctgtttcaaa	gctggctgca	76800
50	ggcccaggtc	catgagactg	ggaagaggac	aggctgtggg	catgtggacc	cacagggggc	76860
	tggggctgca	gaagtcaagt	tggcttccac	catttcagggt	ataaaaaagg	gcattctaagc	76920
	tttcaagaag	agggaggatg	ctctagggca	gcggtccccc	accttttctg	gcaccaggaa	76980
	ccggttccat	ggaagacaat	tttttcacag	gcttgggggt	gggtagggat	gggtttggga	77040
	tagaaaacttc	cacctcagat	catcaggcat	cagattctca	taaggagctt	gcaacctgat	77100
55	ctcttgacaa	cattcagttc	acaatagggt	tcacgctcct	aagagaacct	gatgctgcag	77160
	ctgatctaac	aggagatgga	gctcagggtg	tcacgctcag	tcgctcgcca	ctcacctcct	77220
	gccatgcagt	ccagttccta	acaggcctca	gaccagtacc	ggctctgtggc	ctgggggttg	77280
	aggaccctcg	ctctagggtg	gtactgtgta	tgtttaaaaa	gagagggttt	gccagaaatc	77340
	agatgggaca	aaagggcaaa	ggcctggcca	cagagtgcgc	atatagggga	gagcacgcct	77400
60	ggagccttcg	agagcatgca	gagaagcctg	gagactgcat	ttaccggagc	tgctgcctga	77460
	ggccaccctc	caagtgtccc	cacagcgcac	cacaagacca	caggagtgcac	ctcctcactg	77520
	gcaggtatct	ggggaaacaa	ctgctgtcta	ctcttttggg	taaaaaagtga	aacaccaata	77580
	gtttaattga	aatttcagaa	aattgaacat	atgaacaagg	caataaataa	ctaagtaagt	77640
	taaaaaacaa	aaatatgtcc	aggaagtagc	gatgagaatg	ttcaagttta	agttctccaa	77700
	tgccattgct	acagcaacct	caaaccctag	gttctctctg	cactattaac	cactattact	77760
65	caggacatgg	tttgcttttt	tttaagactt	aaataggaaa	ctaatttttt	tttcttttaa	77820
	gcaattgcgt	tcttcagtga	actctttctt	taggcccagt	gatggcttct	tagcagttta	77880

[illegible]

ES 2 634 450 T3

	gggctttatc	aaaaagtaca	ataataaatc	ctcaggtagt	actgggaatg	gaagactttg	3240
	ccatgggcct	gctgcgtcag	accagtactg	ggaaggagga	cggttgtaag	gcagtcgtta	3300
5	tttagtgata	ttgtgggtaa	cgtgagaaga	tagaacaatg	ctataatata	taatgaacac	3360
	gtgggtatct	aataagaaac	atgatgtgag	attactttgt	cccgtttatt	ctcctccctg	3420
	ttatctgcta	gatctagttc	tcaaatcact	gctccccctg	gtgtactaga	atgcatgtaa	3480
	ggtcttcttg	tgtcctgatg	aaaaatatgt	gcttgaaatg	agaaactttg	atctctgctt	3540
	actaatgtgc	cccatgtcca	agtcacaacct	gcctgtgcat	gacctgatca	ttacatggct	3600
10	gtgggttccta	agcctgttgc	tgaagtcgtt	gtcactcagc	aatagggtgc	agttttccag	3660
	gaataggcat	ttgcctcatt	cctggcctga	cactctagtg	acttcctggg	gagaccggc	3720
	ctgtcctggg	gcagcagggt	ctcgctgtaa	ctcagacatt	ccaaggggat	gggaagccat	3780
	attcacacct	cacgctctgg	acattattta	ggcaagcagg	gacaccccc	gccccccacc	3840
	tttgggatca	gcctctgcca	ttccaagtca	gcactcttct	tgagcagact	gtgatttggg	3900
15	agagaggcaa	ctgctggaaa	ccacacttct	tgaaacagcc	tgggtgacgg	tccttttaggc	3960
	agcctgccgc	cgtctccgtc	tgggttcacc	ttgccgagag	aggcgcgtct	gccccaccct	4020
	cgaaccctgt	ggggcctgat	ggtgctcacg	actcttcctg	caaagggaac	tgaagacctc	4080
	cacattaagt	ggctttttta	caagaaaaac	acggcagctg	tagctccoga	gctactctct	4140
	tgccagcatt	ttcacatttt	gcctttctcg	tggtagaagc	cagtacagag	aaattctgtc	4200
20	gtgggaacat	tcgaggcatc	accccataga	gctgtggtga	ggtgtggata	aggcttaggt	4260
	gccaggctgt	aagcattctg	agctgggctt	gttggtttta	agtctgtgat	atgtatgtag	4320
	tagtttggtt	gtgtatatat	agtagcattt	caaaatggac	gtactgggtt	aacctcctat	4380
	cctcggagag	cagctggctc	tccaccttgt	tacacgtatg	ttagagaggt	agcgagctgc	4440
	tctgctatat	gccttaagcc	aatatttact	catcagggtca	ttatttttta	caatggccat	4500
25	ggaataaacc	attttttacaa	aa				4522

	<210> 4
	<211> 20
30	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> oligonucleótido sintético
35	
	<400>4
	ttgtcgatct gctcgaactc 20
40	
	<210> 5
	<211> 20
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
45	
	<220>
	<223> oligonucleótido sintético
50	
	<400> 5
	Sgacttgctga tctgctcgaa 20
55	
	<210> 6
	<211> 20
	<212> ADN
	<213> Secuencia artificial
60	
	<220>
	<223> oligonucleótido sintético
65	
	<400> 6
	cccggacttg tcgatctgct 20
	<210> 7

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 7
 10 gctcccgac ttgtgatct 20
 <210> 8
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 8
 ccagctccg gactgtcga 20
 25
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 35 <400> 9
 ggcacctcg atcacagcca 20
 <210> 10
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 10
 gctcctcca ctgatcctgc 20
 <210> 11
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 11
 ggtcatgcac aggaggttg 20
 60 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

5 <400> 12
 aggtcatgca caggcaggtt 20

<210> 13
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

15

<400> 13
 gatcaggtca tgcacaggca 20

20

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

30

<400> 14
 tgatcaggtc atgcacaggc 20

35

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

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

40

<400> 15
 acccttgaa tgtctgagtt 20

45

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 16
 55 cccataccct tggatgtct 20

<210> 17
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

65 <400> 17
 tccatacccc ttggaatgtc 20

5 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 10
 <400> 18
 ttcccatacc ctggaatgt 20
 15 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 25 <400> 19
 tattccatgg ccattgtaa 20
 30 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 35 <400> 20
 ttattccatg gccattgtaa 20
 40 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50 <400> 21
 tttattccat ggccattgta 20
 <210> 22
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 60 <400> 22
 gtttattcca tggccattgt 20
 65 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 5
 <400> 23
 ggttattcc atggccattg 20
 10
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 24
 tggttattc catggccatt 20
 25
 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 35
 <400> 25
 atggtttatt ccatggccat 20
 40
 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 50
 <400> 26
 aatggttat tccatggcca 20
 55
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 65
 <400> 27
 aaatggttta ttccatggcc 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN

<220>
 <223> oligonucleótido sintético

5 <400> 28
 aaaatggttt attccatggc 20

10 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

20 <400> 29
 aaaaatggtt tattccatgg 20

25 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

35 <400> 30
 aggaggtcat ttccatggcc 20

40 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

50 <400> 31
 ggtcatttcc atggccagag 20

55 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

65 <400> 32
 ggaggtcatt tccatggcca 20

70 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>

<223> Cebador
 <400> 33
 ctggtttaac ctcctatcct TGGA 24
 5
 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 15
 <400> 34
 cagagcagct cgctacctct ct 22
 20 <210> 35
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Sonda
 <400> 35
 cagctggctc tccacctgtg tacacattat gt 32
 30
 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 40
 <400> 36
 ggagttcgag cagatcgaca un 21
 45 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador
 <400> 37
 55 ggccactcta catgggaagt c 21
 <210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda
 65 <400> 38
 ccatttacca agctgggagg GGAT 24

5 <210> 39
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 10 <400> 39
 tattccatgg ccattgta 18

 15 <210> 40
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 25 <400> 40
 ttattccatg gccattgt 18

 30 <210> 41
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 35

 <400> 41
 tttattccat ggccattg 18

 40
 <210> 42
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 50 <400> 42
 gtttattcca tggccatt 18

 55 <210> 43
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 43
 ggtttattcc atggccat 18
 65

5 <210> 44
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 10 <400> 44
 tggtttattc catggcca 18

 15 <210> 45
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 45
 atggtttatt ccatggcc 18
 25 <210> 46
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 35 <400> 46
 aatggtttat tccatggc 18

 40 <210> 47
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> oligonucleótido sintético

 <400> 47
 aaatggttta ttccatgg 18
 50 <210> 48
 <211> 16
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

 60 <400> 48
 atggtttatt CCATGG 16
 65

<210> 49
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 <400> 49
 10 ttattccat ggccat 16
 <210> 50
 <211> 27
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 20
 <400> 50
 gcgttgctc ttctcttgc gttttt 27
 25 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 51
 35 gaccagctgc gcttctcta 20
 <210> 52
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador sintético
 45
 <400> 52
 cagaggagtc ccccatgatg 20
 50
 <210> 53
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Sonda
 <400> 53
 60 ttggctgtga tcgaaggtgc caaa 24
 <210> 54
 <211> 19
 65 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador
 5 <400> 54
 gggcccttg cctaacaca 19
 10 <210> 55
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 55
 cgacaccct gctttctg 19
 20 <210> 56
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Sonda
 <400> 56
 30 cggtcacttt tgggagatgg tgtgg 25
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65

Reivindicaciones

1. Un compuesto que comprende un oligonucleótido monocatenario modificado, en el que dicho oligonucleótido modificado consta de 20 nucleósidos enlazados que tienen una secuencia de nucleobases que consiste en SEQ ID NO: 26, en el que el oligonucleótido modificado comprende:

un segmento de hueco que consiste en diez deoxinucleósidos enlazados;
 un segmento de ala 5' que consta de cinco nucleósidos enlazados;
 un segmento de ala 3' que consta de cinco nucleósidos enlazados;
 en el que el segmento de hueco está colocado entre el segmento de ala 5' y el segmento de ala 3', en el que cada nucleósido de cada segmento de ala comprende un azúcar modificado de 2'-O-metoxietilo, en el que cada enlace internucleosídico de dicho oligonucleótido modificado es un enlace de fosforotioato, y en el que cada residuo de citosina de dicho oligonucleótido modificado es una 5-metilcitosina.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto consiste en el oligonucleótido de cadena sencilla modificado.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el compuesto es un compuesto antisentido conjugado.

4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el compuesto comprende una sal del oligonucleótido modificado.

5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que la sal es una sal de sodio o una sal de potasio.

6. Una composición que comprende el compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes y al menos uno de un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

7. El compuesto o composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para uso en terapia.

8. El compuesto o composición de la reivindicación 7 para su uso en

a) prevenir, tratar, mejorar, ralentizar la progresión de, o retrasar la aparición de una enfermedad o condición asociada con la PTP1B en un animal; o

b) prevenir o retrasar la aparición de aumento de los niveles de glucosa en sangre en un animal;

c) prevenir, tratar, mejorar, o ralentizar la progresión de una enfermedad metabólica o condición.

9. El compuesto o composición para su uso según la reivindicación 8, en el que

a) el animal es humano;

b) el animal es un animal diabético; y/o

c) los niveles de glucosa en sangre son los niveles de glucosa en plasma o niveles de glucosa en suero.

10. El compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que la enfermedad o afección es:

a) diabetes, opcionalmente diabetes de tipo 2; o

b) obesidad.

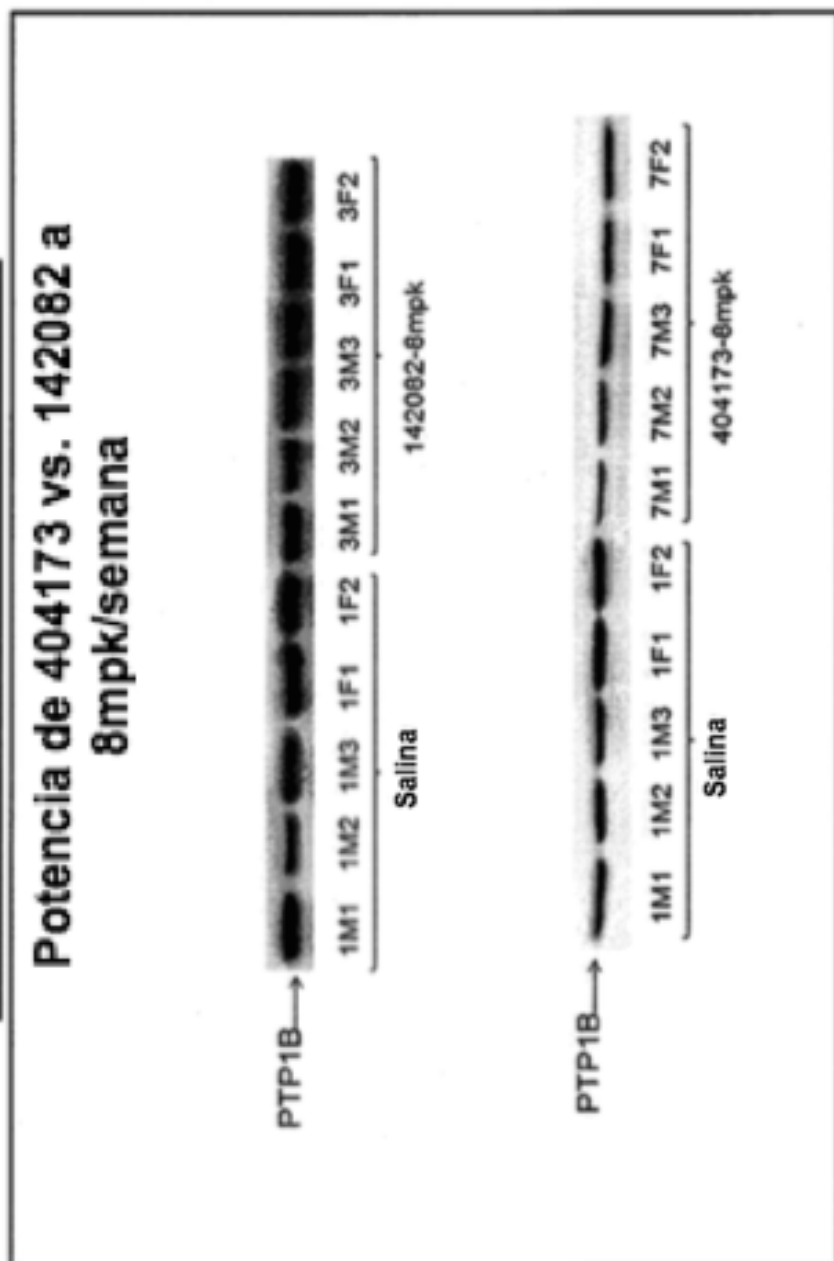


Figura 1

Comparación de parámetros de tolerabilidad claves para 409826, 404173 y 142082

40 mpk/semana			Sobre salina		
ISIS #	Química	Posición marcha	Peso bazo	Peso riñón	Peso hígado
409826	5-10-5	4518	2.5	1.4	1.7
142082	5-10-5	4522	3.0	2.1	1.7
404173	5-10-5	4521	1.6	1.5	1.5

40 mpk/semana	Cambio vs línea de base			
ISIS #	C3	CRP	MCP1	IL-1
Salina	-0.05	0.23	-0.29	-0.44
409826	-0.30	3.90	2.31	2.37
142082	-0.16	14.52	5.36	1.64
404173	-0.18	-0.48	0.82	0.09

* 1 animal muy alto en día 93; de otro modo el incremento era de ~3-4 veces.

Figura 2

ISIS-404173 - un inhibidor más potente **Estudios preclínicos demuestran hasta cinco veces mayor potencia**

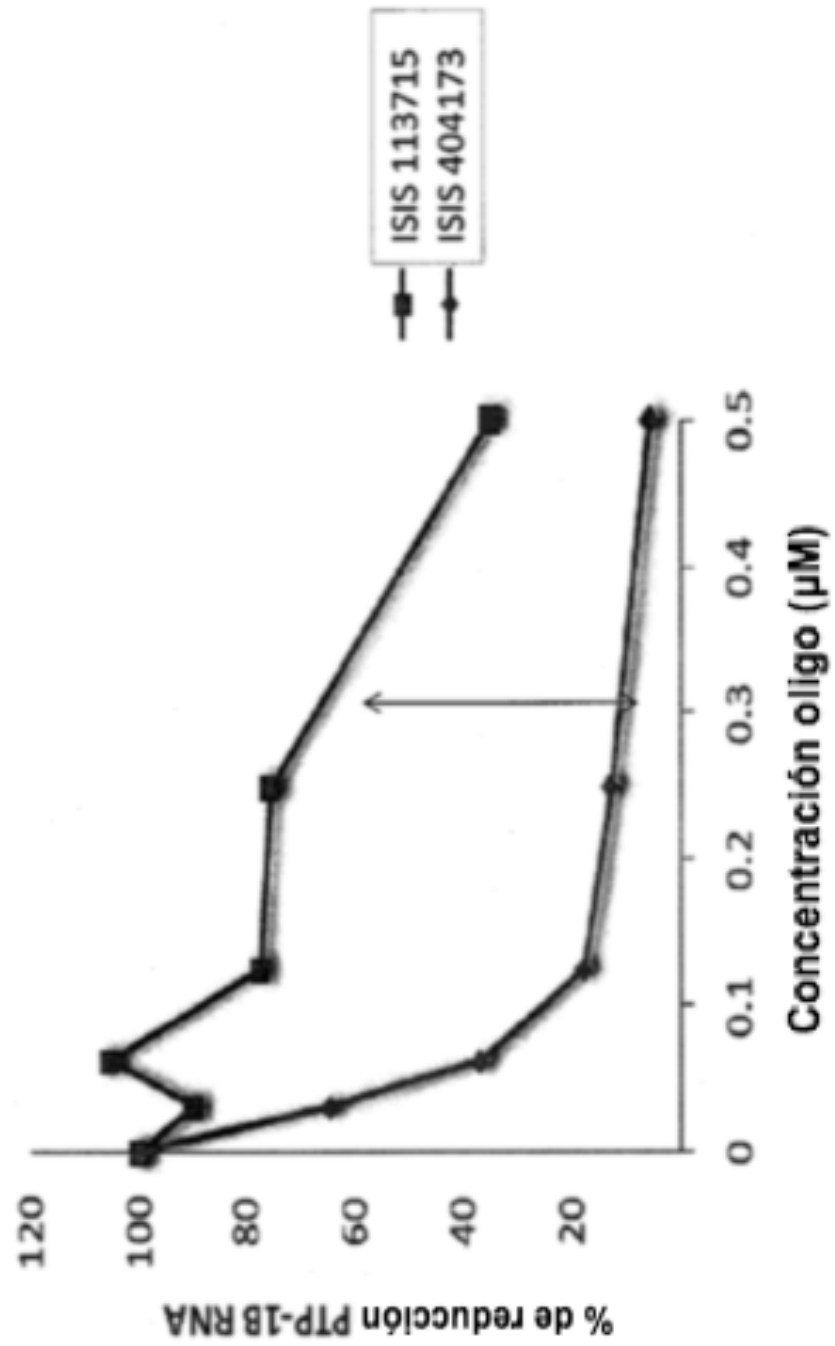


Figura 3